

유용 작물의 유전자 칩 개발 기술
Preparation of DNA chip of useful crops

작물의 유전체 연구를 위한 유전자 칩 개발 기술과 농업적
응용

Development and application of plant DNA chip for
agricultural improvement

경상대학교

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “작물의 유전체 연구를 위한 유전자 칩 개발 기술
과 농업적 응용” 과제의 보고서로 제출합니다.

2002. 11. 5.

주관연구기관명 : 경상대학교

주관연구책임자 : 이 상 열

연 구 원 : 조 무 제

연 구 원 : 임 채 오

보고서 초록

과제관리번호	2000-N-NL-01-C236	해당단계 연구기간	2000. 6. 15. -2002. 6. 14.	단계구분	(1단계)	
연구사업명	중사업명	국책연구 개발사업				
	세부사업명	국가지정 연구실 사업				
연구과제명	중과제명					
	단위과제명 ¹⁾	작물의 유전체 연구를 위한 유전자 칩 개발 기술과 농업적 응용				
연구책임자	이 상 열	해당단계 참여연구원수	총 : 28 명 내부 : 8 명 외부 : 20 명	연구비	정부 : 489,080만원 기업 : 만원 계 : 489,080만원	
연구기관명 및 소속부서명	경상대학교 생명과학과		참여기업명			
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :			
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :			
요약 (연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					면수	90 pages
<p>본 연구는 식물체로부터 새로운 유전자원의 발굴과 3만에서 6만에 이르는 식물 유전자들의 기능규명을 단시간 내에 수행할 수 있는 식물 유전자 칩을 개발하고 이를 이용하여 식물체 유전자의 집단적 발현분석을 통하여 신기능 유전자의 발굴과 새로운 기능의 유전자를 도입한 형질전환 식물체를 제조하고자 하는 것이다. 이러한 연구를 수행하므로서 식물이 받게 되는 다양한 병충해 및 환경 스트레스 저항성 신기능 형질전환 식물체를 제조하여 농업에 응용하고자 하는 것이다. 이러한 연구수행 결과 얻어진 내용을 요약하면 다음과 같다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Microarrayer의 운용체계 및 chip scanner, 화상분석, data 분석용 software 운용기술 확립과 칩 제작용 DNA의 증폭 및 정제와 증폭된 DNA의 chip 부착조건 확립 2. 칩 제작용 유전자 자원의 대량확보와 D/B화 및 칩 분석용 RNA 분리를 위한 cell culture system 구축과 유전자의 특성 분석 3. 식물호르몬, NaCl, 생육단계별 RNA pool 구축 및 표식법 확립과 hybridization, data analysis, gene expression profiling 4. 1차년도 확립한 유전자 칩 제작 조건을 기반으로 3,200개의 cDNA를 포함하는 배추 DNA chip 제작 (BC-EST ver. 1.01) 및 유전자 칩을 이용한 유전자의 집단적 발현 분석 5. 특정 환경스트레스 조건하에서 발현되는 신기능 유전자 발굴과 유전자군의 분자생물학적, 생화학적 특성 및 기능규명 6. 신기능 유전자의 발굴 및 특성 규명과 형질전환 식물체 생성에 의한 in vivo 기능 규명 						
색인어	한글	식물 유전자 칩, 식물 유전자의 집단적 발현분석, 신기능 유전자 발굴, 내재해성 형질전환 식물체 제조, 농업적 응용				
	영어	Plant DNA chip, Massive expression analysis of plant genes, Identification of novel genes, Stress-resistant transgenic plants, Agricultural application				

요 약 문

I. 제 목 : 식물의 생체방어 초기 신호전달 체계규명 및 응용 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

생물체의 전체 염기서열 혹은 대부분의 염기서열 결정이 완료된 후의 나아갈 길은 크게 두 가지로 나누어진다고 생각된다. 하나는 functional genomics (기능유전체학)로 유전자의 발굴 및 기능연구이고 또 다른 하나는 comparative genomics (비교 유전체학)로 생물체의 표준 염기서열 결과를 바탕으로 개체간의 차이, 질병의 발병, 약품, 환경에 대한 차이, 병 저항성, 생산성 증진요인 등을 규명하는 것이다. 이와같이 functional genomics와 comparative genomics의 연구가 따르지 않고는 엄밀히 말해서 이미 확보한 유전자 자원의 산업화는 용이하지 않다. 따라서 생명체의 신비를 밝히고 유전자들의 기능적 특성을 규명하기 위하여 기 확보된 유전자들의 gene expression profile 규명연구는 필수적으로 수행되어야 할 연구과제이며 이러한 연구는 유전자 칩을 이용한 집단적 발현분석을 통해서 가능하다. 유전자 칩 (DNA chip) 개발 및 분석기술은 기존의 분자생물학적 지식에 기계 및 전자공학의 기술을 접목시켜 만들어진 것으로 기계 자동화와 전자 제어 기술, 즉 robotic 제어 시스템을 이용하여 적게는 수백 개로부터 많게는 수십 만개의 DNA를 아주 작은 공간에 고밀도로 집적시킬 수 있는 기술이다. 유전자 칩 기술은 게놈 수준에서 유전자 기능을 탐색함으로써 인체의 질병연구 및 치료를 목적으로 개발, 활용되고 있으며 인류의 식량자원이 되는 식물 분야도 크게 응용될 수 있는 기술이다. 특히, 현재 수백종 미생물의 전체 게놈구조가 결정되어 있고 진핵생물로서 효모 (1998년), *C. elegans* (1999년 2월), 그리고 초파리 (1999년 10월)의 게놈 및 3-5만개로 추정되는 인간 유전자도 거의 완성단계에 있는 상황에서 이들 유전자의 집단적 발현 분석을 통한 유전자의 기능분석은 필수적인 과제가 되었다. 이와같이 유전자 칩을 이용한 광범위한 생명현상 규명과 산업적 응용성은 21세기의 산업구조를 획기적으로 변화시키게 될 것으로 예상되며, 기능이 규명된 유전자원의 산업화, 특허화 등으로 인한 유용 유전자원의 확보는 '국제적 유전자 확보 전쟁시대'인 현 상황에

서 매우 중요한 산업자원으로 부각될 것이다. 따라서 이같은 유전자 칩의 발현분석 연구를 통하여 수십만 개에 달하는 유용생물체의 유전자의 기능규명 및 화학의 주 기울표와 같이 특정 생물체의 유전자 분류가 가능하게 될 것이다. 실제로 유전자 칩 기술의 발전으로 효모뿐 아니라 인간의 암 진단에 이 방법이 이미 시도되고 있고 현재 이 기술의 문제점이 해결되는 대로 이 기술은 질병의 징후를 예측하거나 치료 방법을 선택하는데 유익한 정보를 제공하여 향후 몇 년 이내에 일반병원에서 흔히 사용 가능한 진단도구로 활용되고 있는 상황이다.

이와같이 유전자 칩을 이용한 유전자원의 발현연구는 동물뿐만 아니라, 본 과제에서 추진하는 농업적 응용분야에도 광범위한 응용이 가능하여 다양한 식물 병 저항성, 환경내성 신식물 창출이나 주요 작물의 생산성 증대 및 환경독소 검증과 같은 농산물의 검역체계 등에 널리 이용 가능하다. 따라서 본 연구의 목적은 식물 유전자 칩 분석기술을 이용하여 새로운 유전자 자원을 발굴, 이용하고 3만에서 6만에 이르는 식물 유전자들의 기능연구 뿐만 아니라 병충해 및 환경 스트레스 저항성과 같은 기능별 유전자의 집단적 분류와 이들을 이용한 작물 육종, 첨단 농업, 검역체계, 유전자 재조합 신기능 식물연구 등 광범위한 분야에 활용되어질 수 있도록 식물 유전자 칩을 개발하고 이를 이용하여 식물체 유전자의 집단적 기능분석 및 신기능 유전자의 발굴과 새로운 기능의 유전자를 도입한 형질전환 식물체를 제조하여 식물이 받게 되는 다양한 환경 스트레스에 저항능을 가지는 형질전환 식물체를 제조하여 농업에 응용하고자 하는 것이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구는 식물체로부터 새로운 유전자원의 발굴과 2만에서 6만에 이르는 식물 유전자들의 기능규명을 단시간 내에 수행할 수 있도록 식물 유전자 칩을 개발하고 이를 이용하여 식물체의 유전자의 집단적 기능분석 및 신기능 유전자의 발굴과 새로운 기능의 유전자를 도입한 형질전환 식물체를 제조하고자 하는 것이다. 이러한 연구를 수행하므로써 식물이 받게 되는 다양한 병충해 및 환경 스트레스 저항성과 같은 기능별 유전자의 집단적 발현패턴을 분석하고 신기능 유전자를 발굴하며 이들 유용유전자원을 이용한 작물 육종, 첨단 농업, 검역체계, 유전자 재조합 신기능 식물제조 연구 등 광범위한 분야에 활용하고자 하는 것이다. 본 연구과제에서 수행하고자 계획한 연구개발 내용 및 범위를 요약하면 다음과 같다.

연구 범위	연구 내용
Microarrayer의 운용체계 확립	<ul style="list-style-type: none"> - Microarrayer 구입 및 설치 - Microarrayer 운용체계 및 software 운용기술 확립
Chip scanner, 화상분석, data분석용 software 운용기술 확립	<ul style="list-style-type: none"> - DNA chip 분석기 (scanner) 구입 및 설치 - Scanner의 화상 분석 system, software 운용기술 확립
칩 제작용 DNA의 증폭, 정제	<ul style="list-style-type: none"> - 확보된 식물유전자의 증폭 최적조건 확립 - 확보된 유전자의 고순도 정제 조건 최적화
증폭 DNA의 chip 고형화 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 고형화를 위한 증폭 DNA의 primer modification 조건 확립 - Slide의 종류선별 및 고형 후 분석조건 확립
유전자 칩 제작용 cDNA library 구축	<ul style="list-style-type: none"> - Plasmid cDNA library 2종 구축
대량의 유전자 자원 분리 및 D/B화	<ul style="list-style-type: none"> - Library로부터 5,000개 이상의 신규 EST 유전자원 확보
유용형질 유전자의 발굴과 응용성 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 유용형질 유전자의 발굴과 유전자 구조분석 - 유용 유전자의 특성분석과 형질전환 식물체 제조에 의한 생체 내 기능 분석
칩 분석용 RNA pool 구축	<ul style="list-style-type: none"> - DNA chip 분석용 RNA pool을 위한 cell culture system 확립 - RNA의 역전사에 의한 Cy3, Cy5 표식 및 hybridization 조건 확립
칩 제작용 유전자 자원의 확보 및 유용 유전자 발굴과 특성분석	<ul style="list-style-type: none"> - 유전자 칩 제작용 cDNA library 구축 - cDNA library로부터 대량의 유전자 자원 분리 및 D/B화 - 칩 분석용 RNA 분리를 위한 cell culture system 구축 - 환경스트레스, 내병성 관련 유전자의 분리 및 염기서열 결정과 구조분석 - 유전자의 발현 pattern 분석 및 기능 규명 - 내재해성 형질전환 식물체 제조 및 응용성 연구

IV. 연구수행내용 및 연구개발결과

식물 유전자 칩을 개발하고 이를 이용한 식물체의 유전자의 집단적 기능분석 및 신기능 유전자의 발굴과 새로운 기능의 유전자를 도입한 형질전환 식물체를 제조를 위하여 수행한 연구결과를 요약하면 다음과 같다.

번호	연구내용 및 범위	연구결과
1	유전자 칩의 운용체계 및 칩 제작 최적조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> - Microarrayer의 운용체계 확립 - Chip scanner, 화상분석, data 분석용 software 운용기술 확립 - 칩 제작용 DNA의 증폭 및 정제 - 증폭 DNA의 chip 부착조건 확립
2	칩 제작용 유전자 자원의 대량확보 및 유전자의 특성 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 유전자 칩 제작용 cDNA library 구축 - cDNA library로부터 대량의 유전자원 분리 및 D/B화 - 칩 분석용 RNA 분리를 위한 cell culture system 구축 (배추, 애기장대) - 스트레스, 내병성 관련 유전자의 분리 및 염기서열 결정과 구조분석 - 유전자의 발현 pattern 분석 및 기능 규명
3	배추 cDNA chip 제작 및 유전자 칩을 이용한 유전자의 집단적 발현 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 식물호르몬, NaCl, 생육단계별 RNA pool 구축 및 표식법 확립 - Hybridization, Data analysis, Gene expression profiling - 1차년도 확립한 유전자 칩 제작 조건을 기반으로 3,200개의 cDNA를 포함하는 배추 DNA chip 제작 (BC-EST ver. 1.01) - 각종 스트레스 처리, 발육단계별 등 RNA pool 구축 및 RNA의 표식 - 다양한 조건에서의 hybridization 및 발현 분석조건 최적화 - DNA chip과 RNA를 이용한 유전자의 집단적 발현양상 분석
4	특정 환경스트레스 조건하에서 발현되는 신기능 유전자 발굴과 기능규명	<ul style="list-style-type: none"> - 특정환경조건에서 발현되는 유전자군의 분자생물학적, 생화학적 특성분석 - GenBank나 Swiss-Prot 등의 D/B를 이용한 특정조건에서 발현되는 유전자의 기능 분석 - 신기능 유전자의 발굴 및 특성 규명과 형질전환 식물체 생성에 의한 in vivo 기능 규명

V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구결과를 이용하여 활용할 수 있는 활용분야와 이에 대한 활용용도를 요약하면 다음과 같다.

활용계획 및 가능성	활 용 용 도
유전자 조작식품 분석	단시간 내에 매우 신뢰성이 높은 GMO의 검출 가능 (6-8시간 내 분석 가능)
수출입 작물의 검역	한 장의 칩으로 수출입 작물의 유전자 조작 여부와 병원체 감염 등을 대량진단 가능
식물체 환경 내성 유전자의 발굴	DNA 칩을 사용할 경우 병 해충, 스트레스 저항성에 관여하는 유전자의 집단적으로 발굴과 작용기작 규명가능
신농약 개발을 위한 정보 제공	농약 처리에 의한 병원체의 유전자 발현을 분석함으로써 병원체에 가장 효과적으로 작용할 수 있는 신농약을 개발가능
식물 질병 조기진단	포장에서 칩을 사용하여 진단을 함으로서 적절한 농약선택과 바이러스 감염에 대한 조기 예방가능
의약품 및 생리활성물질의 특성 변환 가능	안정성이나 효과를 증진시키기 위한 유전자 조작방법의 개발로 현재 사용하고 있는 엄청난 양의 의약품이나 생리활성물질 등의 특성을 변화가능
내병성, 내재해성 형질전환 작물의 개발	신기능 유전자를 이용한 유용형질의 형질전환 식물체 제조 가능

S U M M A R Y

It is widely believed that thousands of genes and their gene products in a given living organism function in a complicated and orchestrated way that creates the mystery of life. However, traditional methods in molecular biology generally work on a "one gene in one experiment" basis, which means that the throughput is very limited and the "whole picture" of gene function is hard to obtain. At recent, a new technology, called DNA microarray, has attracted tremendous interests among biologists. This technology promises to monitor the whole genome on a single chip so that we can have a better picture of the interactions among thousands of genes simultaneously. An array is an orderly arrangement of DNA samples. It provides a medium for matching known and unknown DNA samples based on base-pairing rules and automating the process of identifying the unknowns. They are used to directly compare the gene expression profiles of two RNA samples that are simultaneously hybridized to the chip. DNA microarray, or DNA chips are fabricated by high-speed robotics, generally on glass but sometimes on nylon substrates, for which probes with known identity are used to determine complementary binding, thus allowing massively parallel gene expression and gene discovery studies. In order to identify the function of total genomic DNA of Chinese cabbage and rice, we have isolated more than 10,000 ESTs and cDNA clones and prepared the plant DNA chip version I and II. Using the DNA chips, we analysed the expression of thousands of genes in one experiment and identified a large number of novel genes whose functions are not verified yet. For example, cold-resistant genes (Scf1, CaM isotypes), critical genes involved in plant defense signaling system (Mlo, MAP kinase genes), novel redox-regulating genes (Novel Trx, PHGPx homologues), and so on. The data allow us to address many important biological questions that have not been easily addressed with traditional expression-based technologies. Plant cDNA technology may be useful to identify defense genes against various pathogens and environmental stresses, determine susceptible tissues and cell types and extrapolate effects from one species to another. Using the novel functional genes identified, we are preparing pathogen/stress-resistant transgenic plants, which will be advantageous both for the enhancement of agricultural economy and preservation of natural clean environments.

C O N T E N T S

(영 문 목 차)

I. Introduction -----	11
II. Technical status of domestic and foreign sciences--	16
III. Experimental schemes and Results -----	23
IV. Degree of achievements and contribution to other fields of sciences -----	57
V. Application plans for the results -----	60
VI. Scientific technical informations collected from foreign countries during the researches-----	64
VII. References -----	66

목 차

제 1 장. 서론	11
제 2 장. 국내외 기술개발 현황	16
제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과	23
제 4 장. 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	57
제 5 장. 연구개발결과의 활용계획	60
제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보	63
제 7 장. 참고문헌	66
첨부 1.	76
첨부 2.	86

제 1 장. 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발의 목적

유전자 칩 (DNA chip) 개발 및 분석기술은 기존의 분자생물학적 지식에 기계 및 전자공학의 기술을 접목시켜 만들어진 것으로 기계 자동화와 전자 제어 기술, 즉 robotic 제어 시스템을 이용하여 적게는 수백 개로부터 많게는 수십 만개의 DNA 를 아주 작은 공간에 고밀도로 집적시킬 수 있는 기술이다. 유전자 칩 기술은 게놈 프로젝트 및 기능 유전체학 연구분야에 해당하는 기술로 게놈 수준에서 유전자 기능을 탐색함으로써 인체의 질병연구 및 치료를 목적으로 개발, 활용되고 있으며 인류의 식량자원이 되는 식물 분야도 크게 응용될 수 있는 기술이다. 특히, 현재 수백종 미생물의 전체 게놈구조가 결정되어 있고 진핵생물로서 효모 (1998년), *C. elegans* (1999년 2월), 그리고 초파리 (1999년 10월)의 게놈 및 3-5만개로 추정되는 인간 유전자도 거의 완성단계에 있는 상황에서 이들 유전자의 집단적 발현 분석을 통한 유전자의 기능분석은 필수적인 과제가 되었다. 따라서 본 연구의 목적은 식물 유전자 칩 분석기술을 이용하여 새로운 유전자 자원을 발굴, 이용하고 2만에서 6만에 이르는 식물 유전자들의 기능연구 뿐만 아니라 병충해 및 환경 스트레스 저항성과 같은 기능별 유전자의 집단적 분류와 이들을 이용한 작물 육종, 첨단 농업, 검역체계, 유전자 재조합 신기능 식물연구 등 광범위한 분야에 활용되어질 수 있도록 식물 유전자 칩을 개발하고 이를 이용하여 식물체의 유전자의 집단적 기능분석 및 신기능 유전자의 발굴 연구를 수행하고자 하는 것이다. 따라서 본 연구의 최종연구 목표는 다음과 같이 요약할 수 있겠다.

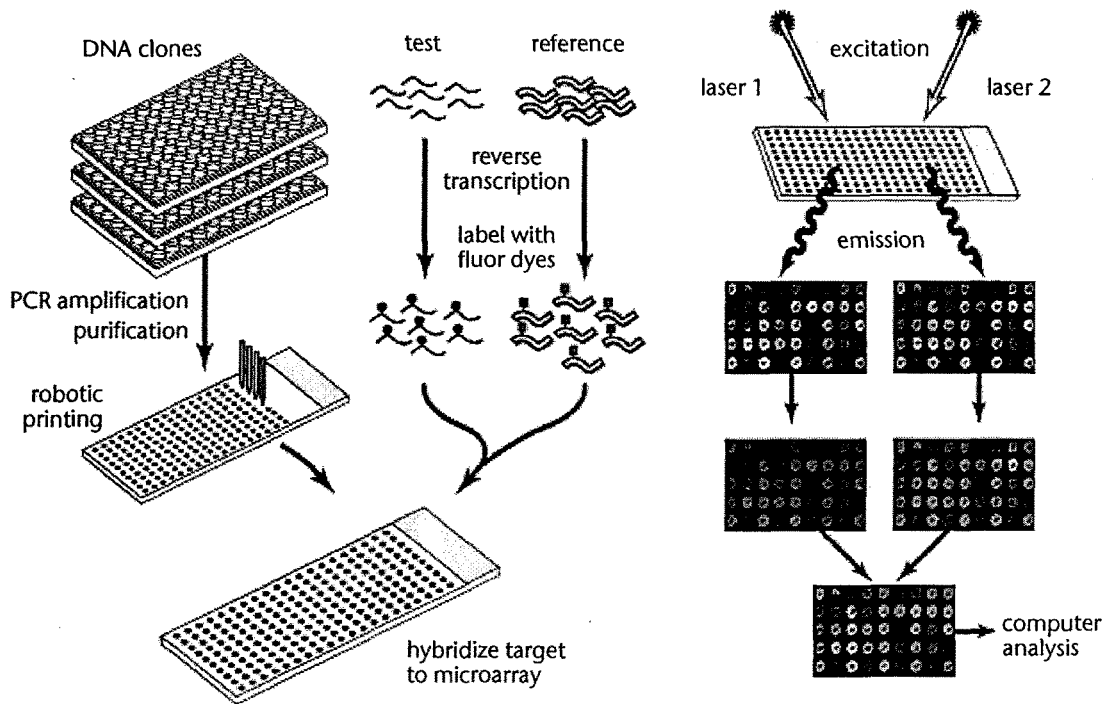
- 1) 차세대 생명공학의 핵심도구인 식물용 DNA 칩 개발에 필요한 제반 기술 확립.
- 2) 유전자 칩 제조에 필요한 유용 식물유전자 cDNA clone들의 대량 확보.
- 3) 유전자 칩을 통해 집단적으로 발현되는 유전자군의 발현 pattern 분석을 통한 새로운 기능의 유전자 규명과 얻어진 생물학적 정보의 D/B화 및 실용화.
- 4) 유전체 연구에 의해 획득한 유용한 정보를 이용한 우수 작물개량 및 유용산물 생산을 위한 system 구축과 산업화.

2절. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 경제·사회·기술적 중요성

1) 기술적 측면

한 생물체의 전체 염기서열 혹은 대부분의 염기서열 결정이 완료된 후의 나아갈 길은 크게 두 가지로 나누어 볼 수 있다. 하나는 functional genomics (기능유전체학)로 유전자의 발굴 및 기능연구이고 또 다른 하나는 comparative genomics (비교 유전체학)로 생물체의 표준 염기서열 결과를 바탕으로 개체간의 차이, 질병의 발병, 약품, 환경에 대한 차이, 병 저항성, 생산성 증진요인 등을 규명하는 것이다. 이와같이 functional genomics와 comparative genomics의 연구가 따르지 않고는 엄밀히 말해서 이미 확보한 유전자 자원의 산업화는 용이하지 않다. 따라서 생명체의 신비를 밝히고 유전자들의 기능적 특성을 규명하기 위하여 기 확보된 유전자들의 gene expression profile 규명연구는 기본적으로 수행되어야 할 필수과제이며 이러한 연구는 유전자 칩을 사용해야 가능하게 된다. Laser-capture Microscopy, cDNA microarray (유전자칩), 대단위 염기서열 결정 기술은 이들 프로젝트의 진행을 돕는데 매우 중요한 도구이자 응용기술이다. 이들 연구를 통하여 수 십만 개에 달하는 유용생물체의 유전자의 기능규명 및 화학의 주기율표와 같이 특정 생물체의 유전자 분류가 가능하게 될 것이다. 실제로 유전자 칩 기술의 발전으로 효모뿐 아니라 인간의 암 진단에 이 방법이 이미 시도되고 있고 현재 이 기술의 문제점이 해결되는 대로 이 기술은 질병의 징후를 예측하거나 치료 방법을 선택하는데 유익한 정보를 제공하여 향후 몇 년 이내에 일반병원에서 흔히 사용 가능한 진단도구로 활용될 것이다. 이와같이 유전자 칩을 이용한 유전자원의 발현 연구는 동물뿐만 아니라, 본 과제에서 추진코자 하는 농업적 응용분야에도 광범위한 응용이 가능하여 다양한 식물 병 저항성, 환경내성 신식물 창출이나 주요 작물의 생산성 증대 및 환경독소 검증과 같은 농산물의 검역체계 등에 널리 이용 가능한 기반기술로서 이 기술의 핵심과정은 그림 1과 같이 요약할 수 있겠다.



<그림 1. 유전자 microarray chip제조 및 분석의 핵심 기술과정 : Nat. Biotech. 1999>

2) 경제 산업적 측면

“유전자 칩이 반도체를 압도하였다”는 것이 21세기의 산업 판도변화를 논하는 전문가의 한결같은 예측으로 볼 때, 생명공학 산업은 정보 통신분야와 더불어 21세기를 주도할 가장 핵심적인 사업으로 기대되고 있다. 이는 전세계에 거세게 불고있는 게놈 (genome)연구의 결실이며 박테리아로부터 인간에 이르기까지 약 10만개 이상의 새로운 유전정보를 가지게 되는 것과 때를 같이하고 있다. 유전자 칩의 분석에 의한 새로 발굴된 유전자의 기능규명과 응용은 인체의 질병을 완치하고 여러 의료, 제약회사에 일대 큰 변혁을 줄 것이다. 2010년을 기점으로 생명공학 산업의 핵심부분인 유전자 칩이 반도체를 능가하였다는 분석으로 볼 때 이 유전자 칩에 대한 국가적인 차원에서 지원이 얼마나 시급한지를 실감케 하고 있다. 이와같이 유용유전자원을 이용한 cDNA chip의 산업적 활용 가능 분야를 나열하면 다음과 같다.

- 인체 유전자 기능 분석 연구
- 유전자 재조합 식물 연구 및 산업화
- 실험용 동식물 모델 연구

- 암 및 질병관련 유전자 진단
- 유전자 치료
- 임상 병리학
- 동, 식물 검역
- 환경변화에 따른 생태학 연구
- 식품 안정성 검사
- 신약개발 등

이와같이 유전자 칩을 이용한 광범위한 생명현상 규명과 산업적 응용성은 21세기의 산업구조를 획기적으로 변화시키게 될 것으로 예상되며, 기능이 규명된 유전자원의 산업화, 특허화 등으로 인한 유용 유전자원의 확보에 있어서 '국제적 유전자 확보 전쟁시대'가 도래할 것으로 예상될 만큼 중요한 산업자원으로 부각될 것이다. 이러한 국제적인 연구투자와 관련하여, 우리나라의 산업 자원부에서도 앞으로 10년간 이 분야에 100억원을 지원키로 결정하였으나 이들의 지원은 대개 동물에 치중되어 있고 인류 식량자원의 유일한 공급원인 식물에 대한 투자는 거의 제외되어 있는 상황이다.

다행히도 본 연구팀에 의한 경상대학교 유전자 은행이 활발히 운용되고 있어 이를 바탕으로 식물 DNA chip을 지금 제작하고 운용하였다면 충분히 국제적 위상을 확보할 수 있을 것으로 확신하며 유용식물 유전자원을 이용한 산업화 및 응용에 있어서 국제적인 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 판단된다.

3) 사회, 문화적 측면

본 연구과제의 성공적인 수행으로 얻어질 사회 문화적 중요성은 크게 두 가지로 나눌 수 있겠다. 하나는 생명공학 산업의 가장 중요한 특성의 하나인 고도로 훈련된 연구 인력에 의한 고부가가치 상품생산이 가능한 고급인력의 배출이고, 또 다른 하나는 환경친화적 산업기술의 개발이다. 20세기 후반에 들어서면서 환경에 대한 경각심이 높아지고 산업생산에서 새로이 나타나는 중요한 흐름의 하나가 자연환경보호와 문화재 보존 등 모든 인류 삶의 방면에서 환경친화적인 산업화, 문화화에 대한 요구가 강하게 부각되었다. 따라서 21세기에는 산업현장 및 인류의 삶과 상품생산 등 모든 방면에서 환경요소가 중요한 비중을 차지하게 되므로서 환경친화적인 생명공학 기법을 이용하게 되는 시대가 온 것이다. 더욱이 이제까지 인류의 산업화 과정에서 나타난 환경파괴, 자연훼손 및 온갖 질병과 공해문제로 인한 인류의 삶의 터전이 황폐화됨으로서 나타나는 생물적 기형과 비정상적인 자연생태계의 변화, 기후 등, 인류의 능력으로 감당할 수 없는 수많은 변화들이 나타나게 되었

다. 이들에 대한 근본적인 해결책이 요구되고 있는 상황에서, 다양한 새로운 기능의 유전자원의 발굴, 기능규명 및 응용에 의한 생명공학 기술의 개발은 엄청난 시설과 환경 오염물질을 생산하던 중화학 공업의 기반을 지식위주의 생명공학 기술로 전환하게 될 것이다. 이렇게 발전된 생명공학 산업은 소규모의 연구실 단위에서도 전 세계적으로 유용하게 활용될 수 있는 생명공학 제품을 개발, 생산할 수 있으며, 일단 개발에 성공하면 오랫동안 거의 독점적 위치를 누리는 산업적 특성을 가지고 있다. 이러한 여러 가지 측면을 고려해 볼 때 우리나라와 같이 높은 지식수준과 천연자원이 부족한 나라에서 산업화시키기에 더없이 좋은 미래산업의 하나가 될 것이다.

제 2장 국내 외 기술개발 현황

1절. 국외의 연구개발 내용

1995년 미국 Stanford 대학 생화학과 (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/>)에서 세계최초로 유전자 칩 제작 기술을 개발한 이래 그 산업적 응용 가능성 때문에 10 개 이상의 회사에서 경쟁적으로 개발하고 있으며, Cartesian, Genomic solution, Biorobotic, Incyte, Hyseq, Clinical Micro Sensors, Nanogen 등의 기업에서 핵심기술의 자동화 및 상용화를 이루기도 하였다. 또한 Affymetrix사 (<http://www.affymetrix.com>)에서는 15-25 개의 핵산으로 구성된 염기서열을 이용한 oligo-chip의 개발에 성공하였는데 현재 최고 40만개의 oligonucleotide를 집적시키는 수준에 이르렀다. 이런 성과를 기반으로 미국, 유럽 등지에서는 실리콘으로 만들어진 반도체 칩 대신 유전자 정보를 담은 수천 여종의 DNA 칩의 개발이 활발히 진행 중에 있다. 유전자 연구의 획기적인 진전을 가져오고 있는 유전자 칩은 현재 미국에서 일부 상품화되고 있을 정도로 개발속도가 빠르고, 현재 몇몇 회사에서 개발하여 사용하고 있는 대표적인 유전자 칩 기술은 표 1과 같다. 유전자 칩의 세계시장 규모는 지난해 3억 달러에 그쳤지만 오는 2010년경에는 1백 50억불 규모에 달할 것으로 예측되고 있다. 이미 미국의 경우 이 분야 벤처기업들이 대거 쏟아져 나올 만큼 연구가 활발하나 우리 나라의 경우, 이 분야의 연구는 시작 단계에 있으며 특히 식물의 경우는 전무하다.

<표 1. 대표적인 DNA chip 제작 기술 및 개발회사>

Chip 제작 기술	특 징	Chip 종류	Chip 제작 개발회사
Pin microarray	Pin을 이용한 micro dotting	cDNA/oligonucleotide	Hyseq, Incyte
Inkjet	Inkjet 원리를 이용한 micro dropping	cDNA/oligonucleotide	Incyte
Photolithography	Photolithography를 이용한 직접합성	Oligonucleotide	Affymetrix
Electronic array	전기를 이용한 oligonucleotide addressing	Oligonucleotide	Clinical Micro Sensors/Nanogen

2절. 국내의 연구개발 내용

현재 국제 수준의 연구가 진행되고 있는 functional genomics의 연구 경향에 따라 국내에서도 최근 인체 유전자의 유전자 칩에 대한 연구투자가 시작되고 있는데 몇 가지 예를 들자면 다음과 같다.

- 1) 산업자원부에서 향후 10년간 칩의 hard & soft ware 개발에 100억을 지원키로 하였고
- 2) '99년 (주) Bioneer 등에 hard ware 및 칩을 개발하는 벤처기업에 연구비를 지원하며,
- 3) 한국과학기술원 (KAIST) 의과학 연구센터, 서울의대 종양연구소, (주) 마크로젠 등에서 인간의 질병 진단용 유전자 칩을 개발하기 위한 연구개발이 활발히 진행 중이다.
- 4) 또한, 벤처와 학계뿐만 아니라 삼성종합기술원 같은 대기업 소속의 연구소에서 유전자 칩 개발을 시작하고 있다. 하지만, 이러한 연구는 이제 막 시작단계에 있기 때문에 국제적인 경쟁에서 한걸음 늦은 단계에 있는 실정이다.

그러나 본 연구팀에서는 세계적 유전자 자원 확보 경향을 비교적 일찍 인식하고, 다른 선발 국가와 비슷한 시기에 우리 나라의 대표적인 채소작물인 배추를 대상으로 cDNA project (<http://nongae.gsnu.ac.kr/~tbcg>), 생체방어신호전달관련 유전자 pool 구축사업을 시작하여 유전자 확보 경쟁에서 식물분야의 국제적 우위를 확보하고 있다. 특히, 1992년부터 배추 유전자은행을 설립, 배추로부터 유용 유전자 자원(EST)을 확보해 왔고, 확보된 유전자 자원은 국내뿐 아니라 국외 database에 그 정보를 등록하여, 각 유전자에 대한 정보제공과 유전자 자원을 필요한 연구자들에게 분양함으로써 선발국과 함께 동등한 유전자 자원 주도권 확보 및 국제적 위상을 정립하고 있다. 본 연구팀에서 확보한 식물 유전자 자원은 full-length gene과 EST를 합하여 약 10,000개이며 현재 세계 8위(1997년 기준 세계 3위)를 마크하고 있으며 최근까지 분리한 유전자를 등록할 경우 약 12,000 개의 유전자가 이미 확보되어 있다 (표2). 하지만 *Arabidopsis*, 벼, 토마토 등에 비해 아직 더 많은 유전자 자원을 확보할 필요가 있으며, 본 사업이 성공적으로 수행될 경우, 향후 5년 이내에 이들과 비슷한 수준의 식물 유전자가 확보될 수 있을 것으로 예상된다. 또한 유전자 칩 기술은 방대한 계층정보를 한 장의 칩에 담은 DNA version으로, data의 해석을 위해서는 genome project의 성과를 담은 각종 database와 연결해야 만 하였다. 따라서 본 연구팀에서는 확보된 기존의 식물 유전자 자원과 bioinformatics를 기반으로 식물 유전자 칩을 개발하고, 개발된 칩을

<표 2. NCBI의 dbESTdp 등록된 주요 식물 EST 등록현황; 1997년 1월 4일 기준>

학 명 / 종 명	EST 등록갯수
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomato)	50,303
<i>Zea mays</i> (maize)	49,804
<i>Oryza sativa</i> (rice)	47,690
<i>Arabidopsis thaliana</i> (thale cress)	45,757
<i>Glycine max</i> (soybean)	44,572
<i>Gossypium hirsutum</i> (upland cotton)	9,335
<i>Sorghum bicolor</i> (sorghum)	5,226
<i>Brassica napus</i> (oilseed rape)	1,702
<i>Brassica campestris</i> (field mustard)	963
<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>	934

작물의 개선, 다양한 환경 및 병해충에 대한 저항성 유전자들의 집단적 발현 양상 연구, 신 기능 작물의 개발 및 식물 유전자 칩의 상품화에 주력할 것이고 이러한 연구가 성공적으로 진행된다면, 향후 5년 이내에 국내 식물 유전자 칩 개발 분야의 국제적 경쟁력을 확보하고 신기능 유용작물창출 및 다양한 농업적 응용에 활용할 수 있을 것으로 확신한다.

3절. 연구결과가 국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

앞에서 기술한 바와 같이 유전자 칩 분석 기술은 크게 두 부분으로 나누어 구분할 수 있는데 이들 기술 중 핵심은 칩에 부착할 수 있는 유전자를 얼마나 많이 보유하고 있는가 하는 점이고 둘째는 유전자원의 집단적 발현분석을 위하여 얼마나 많은 유전자원을 아주 적은 공간에 집적시킬 수 있는가 하는 고밀도 array 제작 및 분석기술로서 이들 유전자원의 발현 pattern을 분석을 통하여 유전자의 기능규명과 생명체를 위한 응용연구분야이다. 이들 두 parts 기술에 대한 식물분야의 현재 연구수준을 국내 및 본 연구팀의 기술상태와 국제적인 연구 group 들간의 기술수준을 항목별로 비교해 보고자 하였다.

가. 유용 유전자원의 확보분야: 유전자와 유전자 산물의 기능을 연구키 위해서는 모든 유전자가 발굴되어야 하는데, 이를 위해 사용하는 방법으로는 무작위적으

로 각각의 cDNA를 분리하여 염기서열을 결정하거나, 기능이 잘못된 식물로부터 기능상 중요한 유전자를 발굴하고 관련된 유전자를 추가 분리하였다. 고등생물(식물)의 유전체는 다른 하등모델 생명체의 유전체보다 훨씬 복잡하여, 유전자로 추정되는 부분은 전체의 2% 정도에 지나지 않는데다가 거의 모든 유전자가 exon과 intron으로 이루어져 있어 genomic DNA의 염기서열 결과로부터 유전자를 발굴하는 것이 쉬운 일이 아니다. Gene trapping과 direct cDNA selection으로 유전자를 찾을 수 있고 혹은 컴퓨터 소프트웨어를 이용하여 유전체의 염기서열부터 모든 유전자의 존재를 예측하는 것도 가능하다. 어떤 방법을 이용하더라도 완벽하지 않으며 설사 유전자를 찾았다 하더라도 그 유전자에서 여러 개의 전사물이 생성되는 경우 그 모든 전사물의 발굴이 어렵다. 따라서 아무리 한 생물체의 전체 염기서열을 가지고 있다고 하여도 발현되는 유전자를 찾는 cDNA 프로젝트의 도움 없이는 모든 유전자의 발굴은 어려울 것으로 예상된다. 이런 이유로 앞에서 언급한 바와 같이 미국, 일본, 구라파 등 기술선진국에서는 유용 유전자 자원을 확보하기 위한 연구에 대대적인 투자를 하고 있다. 대표적인 예로, 인간의 게놈 프로젝트 (human genome project, 미국, 일본 및 유럽연합) 및 cDNA project (미국)를 들 수 있다.

식물분야에 있어서는 벼의 cDNA project (일본, 중국, 한국) 및 *Arabidopsis* cDNA (미국, 프랑스) 및 genome project (미국 및 유럽연합)를 들 수 있다 (표3). 이들 cDNA project와 genome project를 통하여 확보된 유전자 정보는 database화 되고 있고, 후발국들은 구축된 database로부터 정보를 얻고 이를 이용하여 생명과학분야의 연구를 수행하는 상태에 있다. 현재 이들 유전자 정보는 internet상에서 자유롭게 이용할 수 있으나, 앞으로 이들의 기능이 규명되는 경우 유료화 될 가능성이 매우 크다. 그러나 이러한 정보의 유료화보다는 유전자 자원의 배타적 이용권은 보다 심각한 상황을 초래하게 될 것이다. 유전자 자원의 배타적 이용권을 부여하려고 한 단적인 예로, cDNA project를 통하여 확보된 EST (expressed sequence tags)를 특허화하고자 시도했던 미국 NIH(국립보건원)의 노력은 우리들이 앞으로 대처해야 할 방향을 분명히 보여준 사건이며, 이러한 시도는 앞으로도 계속되어질 것으로 예상된다. 각국이 자국의 유전자를 특허화하고 이들을 산업 자원화하고 있으므로 인하여 산업적인 이용은 물론이거니와 심지어는 학술적인 이용마저도 심각한 지장을 초래하게 될 것이다. 현재, 염기서열이 모두 밝혀진 유전자에 대해서 그 유전자 산물이 산업적 가치를 가질 때, 특허화 하는데 아무런 어려움이 없다. 따라서 각국은 자국에 필요한 여러 가지 유용 유전자를 확보하고 이를 이용하고자 하는 노력이 경주되어지고 있다.

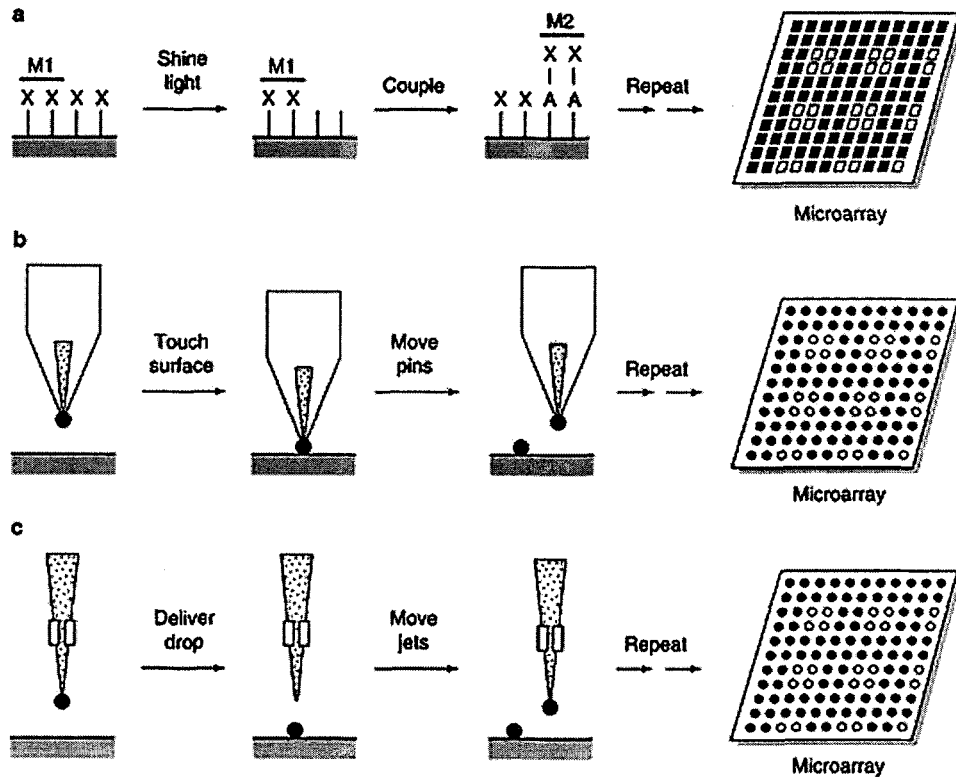
<표3. 미국 NSF에서 genome project로 추진하는 projects>

Project P. I. (책임자)	연구소	연구제목
Pamela J Green	Michigan State University	Functional analysis of the Arabidopsis genome via gene disruption and global gene expression analysis
Shauna Somerville	Carnegie Institute of Washington	Microarray contact
John Ohlrogge	Michigan State University	Microarray contact
Mike Cherry	Stanford University	Bioinformatics contact
Virginia Walbot	Stanford University	Maize gene discovery, sequencing and phenotypic analysis
David Galbraith	University of Arizona	Microarray contact
Lila Vodkin	University of Illinois Urbana-Champaign	Functional genomics program for soybean
Randy C Shoemaker	Iowa State University	EST contact
Steven Tanksley	Cornell University	Development of tools for tomato functional genomics:
Hans Bohnert	University of Arizona	Genomics of plant stress tolerance
Nina V Federoff techniques	Pennsylvania State University	New DNA microarray detection in the study of stress-induced changes in plant gene expression
Rod A Wing	Clemson University	A BAC library resource of crop genomics
Bertrand Lemieux	University of Delaware	Genomic analysis of seed quality traits in corn

유전자 발현 기능 분석용 칩 개발에 있어서의 관건은 칩에 부착할 수 있는 유전자를 얼마나 많이 보유하고 있는가 하는 점이다. 따라서 미국과 일본에서 주로 시행되고 있는 벼의 genome 프로젝트와 *Arabidopsis* genome 프로젝트와는 별도로 국내에서도 이들 유전자 cDNA pool을 보유하고 있어야 하는데 본 연구팀은 이미 식물 유전자 자원 확보에서 국제경쟁력을 확립 (식물유전자 확보율 세계 8위) 하고 있고, 이들 유전자 자원을 활용하면 식물 유전자 칩 개발에 있어서도 국제적 경쟁력을 갖출 수 있을 것으로 예상된다. 따라서 본 연구팀에서는 기 확보된 기존의 식물 유전자 자원과 bioinformatics를 기반으로 식물 유전자 칩을 개발하고, 개발된 칩을 작물의 개선, 다양한 환경 및 병해충에 대한 저항성 유전자들의 집단적 발현 양상 연구, 신 기능 작물의 개발 및 식물 유전자 칩의 상품화에 주력할 것이고 이러한 연구가 성공적으로 진행된다면, 향후 5년 이내에 국내 식물 유전자 칩 개발 분야의 국제적 경쟁력을 확보하고 신기능 유용작물창출 및 다양한 농업적

응용에 활용할 수 있을 것으로 확신한다.

나. 고밀도 유전자 칩 제작 및 분석기술 분야: 단위 면적당 수만개의 유전물질을 균일한 농도로 고정시키는 고밀도 유전자 칩 제작기술은 제작방법에 따라 photolithography(a) 방식, pin microarray(b) 방식, inkjet(c) 방식 등이 개발되었는데 이들 기술에 대한 개요는 그림 2과 같다. 이중 Pin microarray chip 기



<그림 2. DNA chip 제작 방법>

술은 1995년 미국 Stanford 대학의 생화학과에서 처음 개발되었으며 약 2 ~ 3천개의 유전자를 약 1 cm² 안에 붙일 수 있다 (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/>). 처음에는 유전자 발현 측정을 목적으로 cDNA를 붙여놓은 chip을 만들었기 때문에 cDNA microarray chip이라고 불렸지만 지금은 돌연변이를 검색할 수 있도록 oligonucleotide를 같은 방법으로 붙인 chip도 개발되었다. DNA microarray는 수십개의 glass slide들을 놓는 곳과 PCR 된 유전자를 담고 있는 96well plate를 놓는 곳, DNA를 glass slide에 옮겨 주는 역할을 하는 pin이 붙어 있는 robotic print head의 세 부분으로 나누어져 있다. 이 pin이 DNA를 96well plate로부터 담아서 glass slide로 computer가 지정한 똑같은 장소에 심는 것이다. 이렇게 개발된 cDNA microarray chip은 두가지 다른 환경에서 발현되는 독특한 유전자들의

분석과 수천개 이상의 유전자 발현변이를 단 한번의 실험으로 검색할 수 있다. **Inkjet microarray chip**기술은 pin 대신에 computer inkjet printer에서 쓰이는 것과 같은 원리의 cartridge를 사용하였다는 점이 microarray chip와 다르며 (<http://www.biodot.com/>), 각각의 cartridge 안에는 유전자가 들어 있어서 전기적인 힘으로서 유전자를 고형체 위에 뿌리게 되는 것이다. 지금까지 뿌리는 방법에 따라서 thermal, solenoid 그리고 piezoelectric의 3가지 방법이 있다. 이 기술들의 장점은 유전자를 전기적으로 chip 표면에 닿지 않고 뿌릴 수 있기 때문에 정량의 유전자가 붙어 있는 많은 수의 chip을 생산할 수 있다는 것이다. 하지만 많은 종류의 다른 유전자를 가진 DNA chip을 생산하기 위해서는 cartridge 안의 유전물질 교환에 문제가 남아있다. 마지막으로 **Photolithograph chip** 제조방식은 미국의 Affymetrix라는 회사가 computer chip을 만들기 위해서 쓰는 photolithography라는 기술을 사용하여 수 만개의 다른 염기들을 하나의 유리 위에 직접 합성하는데 성공한 방식이다. (<http://www.affymetrix.com/>). Affymetrix는 이 기술을 사용하여 초기에 1.28 cm² 안에 65,000개의 다른 oligonucleotide를 가진 chip을 만들었고 지금은 400,000개의 다른 oligonucleotide를 가진 chip을 만들 수 있다. Oligonucleotide가 합성되는 유리의 표면은 각각의 염기들이 합성할 수 있게 보조체가 붙어 있다. 제작가격이 비싸고 cDNA chip에 비해서 일반용으로 사용키가 쉽지 않으며 유전자 특이적 oligonucleotide가 각각 유전자마다 디자인되고 합성되어야 하였다. 이와같이 미국의 우수대학이나 생명공학 회사들이 유전자 칩 제조장치를 개발하여 실용화단계에 접어들고 있으나, 이 분야에 대한 국내 연구개발 투자는 이제 시작 단계이다. 이 분야에 대한 투자상황을 살펴본다면, 우선 산업자원부의 연구개발비 지원발표와 함께 과학기술부의 "21세기 프론티어 연구개발사업"에 참여하는 많은 연구진이 유전자 칩 개발에 참여할 것으로 예상되고 있다. 또한 민간 기업의 경우, (주)마크로젠, SJ 하이테크, 바이오니아를 비롯, 생명공학 벤처기업들의 코스닥 상장으로 많은 연구 개발비를 확보할 수 있을 것이며, 유전자 칩 개발에 대한 연구 개발 투자는 지속적으로 증가될 것으로 예상된다. 따라서 '98년까지의 본 분야에 대한 투자는 아주 미미하였으나, '99년부터 활발한 투자가 시작되어 매년 150억 이상의 연구 개발비가 유전자 칩 개발에 집중될 것으로 전망된다.

3장. 연구개발 수행내용 및 결과

1절. 연구개발의 이론적, 실험적 접근방법

본 연구를 수행하기 위한 기술적인 실험 방법들은 아래에 기술되어진 항목을 기본으로 하고, 최신의 새로운 연구방법이나 기법들을 수시로 개발, 도입 적용하였다.

가. 유용 식물 유전자의 분리 및 대량확보

- 1) cDNA 또는 EST의 대량 확보: 효과적인 EST 생성을 위해서는, 먼저 적절한 cDNA library를 구축하는 것이 선결과제이다. 즉, 대량의 sequencing을 수행하기 위해서는 DNA 분리가 쉽고 sequencing을 수행하기 편리한 cDNA library를 구축할 필요가 있다. 본 연구에서는 이러한 효과적인 cDNA library를 구축하고, 구축된 cDNA library로부터 무작위적으로 선택한 clone의 sequencing을 수행하였다. Sequencing한 DNA는 국제유전자 database인 GenBank/EMBL, 단백질 (Swiss-plot, PIR 등), dbEST에서 FASTA program을 이용하여 sequence를 분석, 분류하고 국제적 유전자 등록기구 (GenBank/EMBL, DDBJ 등)와 본 연구과제의 수행의 일환으로 자체의 gene database를 구축하였다.
- 2) RNA differential display: RNA differential display의 primer는 GenHunter Corp.에서 구입하였다. 3' poly(A) RNA에 붙을 수 있는 3' 쪽 primer는 3가지이며 (oligo M-T11 (M은 G, A, 혹은 C중 하나))와 5' primer로 80개의 10 base의 arbitrary oligomer를 이용할 것이다.
- 3) RNA preparation: RNA differential display에 사용되는 RNA sample의 DNA 오염이 없애기 위하여 RNA 추출과정에서 LiCl나 CsCl를 이용하지 않고 acid phenol로 DNA 오염을 줄이면서 total cellular nucleic acids을 추출한 후 RNase free DNase을 다시 처리하였다.
- 4) Differential screening: Total RNA를 병원균 elicitor을 처리한 조직(뿌리와 잎)과 처리하지 않은 조직으로부터 분리하고 이들로부터 먼저 cDNA를 만들고 이들 cDNA 중에 병원균 elicitor로 처리한 cDNA를 이용하여 library를 구축하였다. 이 cDNA library를 병원균 elicitor로 처리하지 않은 조직으로부터 만들어진 cDNA를 ³²P로 labeling하여 probe를 만들고 이를 probe에 의하여 나타나지 않는 cDNA clone을 확보하였다.

5) Subtraction cDNA library 구축; 두 종류의 조직으로부터 cDNA library를 구축하고 상대편의 cDNA를 이용하여 subtraction하여 구축하였다. 이를 위하여 이들 cDNA library는 single strand DNA를 만들수 있는 vector를 이용하고 이들 cDNA library로부터 single stranded cDNA를 얻은 뒤에 상대편 조직의 total RNA를 이용하여 subtraction 하였다. 이때 상대 RNA는 biotin에 의하여 labeling 하여 control single stranded cDNA와 biotinylated RNA와 hybridization을 행하고 이들을 avidine을 이용하여 biotinylated RNA를 제거함으로써 두 조직에 동일하게 존재하는 cDNA는 제거하였다.

나. 유전자 칩의 개발 방법 : DNA 칩은 크게 3단계의 개발과정을 거치게 된다. 1 단계는 sample로부터 RNA를 추출하는 단계이고 2단계는 DNA chip 제작과 그 이용에 관한 것이며 3단계는 이들의 분석과정으로 이들을 세분화하여 설명하면 아래와 같다.

1) DNA Spotting; 실제 DNA chip의 개발에 가장 중요한 요소는 고밀도로 DNA를 일정한 공간에 부착시키는 기술의 개발이다. 본 연구에서는 pin microarray, inkjet, photolithography, electronic array 방법 중 1995년 미국 Stanford 대학이 개발한 pin microarray (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown>)를 사용할 것이며 약 1 cm² 의 glass slide에 2-3천개 이상의 유전자를 부착할 수 있는 기술을 개발하였다.

2) Labeling and Detection; 최근 형광물질을 이용한 DNA 또는 RNA의 labeling과 laser를 이용한 검색 기법이 꾸준히 발전하여 왔다. 이러한 방법을 사용하여 각각의 sample을 각기 다른 형광으로 표시할 수 있다. 즉 두 개의 다른 환경에서 얻은 세포들로부터 total RNA 또는 mRNA를 추출한 뒤 이들 mRNA를 reverse transcription시킬 때 각각 다른 색깔의 형광 물질을 띤 염기를 첨가하여 빨간색 (Cy5)이나 녹색 (Cy3)을 띤 cDNA를 합성하였다. 합성된 두 개의 cDNA를 똑 같은 양으로 섞어서 하나의 cDNA microarray chip에 결합시킨다. 결합이 안된 유전자들을 씻어낸 칩은 laser fluorescence scanner에 의하여 읽혀진다. 각각 유전자의 형광 정도는 그 유전자의 발현정도를 알려주는 것으로 이들 정보는 computer에 의하여 분석하였다.

3) 3단계 data 분석; 한번의 실험으로 수 천가지 data를 분석해야하는 상황이 발생하므로 이들을 효과적으로 분석하고 그 결과를 공유하고 저장하는 것이 중요한 요소가 된다. 현재 이러한 프로그램의 개발이 다양하게 이루어지고 있으며 그 결과들이 많은 database들과 연계되어 체계화 되어가고 있다. 분석된 식물 유전자 data는 자체의 database 및 bioinformatics를 구축, 제공하였다.

다. 식물 생체방어 유전자의 발현과 조절연구

- 1) Total RNA 및 genomic DNA의 분리; Total RNA는 LiCl/phenol 방법을 이용하여 식물체로부터 순수분리하고, Genomic DNA는 식물체의 조직을 액체질소로 얼린 후 proteinase K로 처리한 후 CsCl gradient를 이용하여 분리하기로 하였다.
- 2) Southern 및 Northern blot hybridization; 실험하고자 하는 DNA를 필요에 따라 restriction enzyme으로 자르고 standard 방법으로 Southern blot을 nylon membrane 이용하여 수행하였다. Northern blot은 formaldehyde 방법을 이용하여 gel electrophoresis 하고 nylon membrane에 transfer 하여 blot을 만들고, probe를 random priming 하거나 PCR labeling 방법에 의해 ^{32}P 로 labelling 하여 hybridization하기로 하였다.
- 3) Expression vector의 구축; 일차적으로 여러가지 상업화된 vector를 이용하여 test하고 새로운 secretion vector를 여러 종류의 bacteria 유전자에서 leader sequence나 다른 signal sequence 및 inducible expression system을 응용하여 발현시키고자 하는 host에 적당하도록 변형시킨 inducible expression system을 구축하였다.

라. 유용작물의 형질전환 및 재분화 기술의 최적화

- 1) 유용작물 (토마토, 감자, 유채, 벼 등)의 형질전환 기법 개발과 최적조건 확립; DNA gene-gun 방법, PEG나 electroporation 방법 등을 이용한 protoplast regeneration 법 등을 이용한 유용작물에 대한 형질전환 방법의 효율을 증가시킨다. 이와함께, 최근 본 연구팀에서는 "superbinary" vector system을 개발하여 *Agrobacterium*으로부터 T-DNA를 작물에 도입하는 형질전환 체계를 확립하여 이용하고 있다.
- 2) Transgenic plants 에서 overexpression을 위한 heterologous expression system 구축; 여러 다른 생체의 expression system (T7 RNA polymerase와 같은)을 이용하여 작물에 protein을 overexpression 할 수 있는 system 구축하고자 하였다.
- 3) Inducible expression system 의 구축; 다른 생물체의 inducible expression system을 응용하여 식물체에 적당하도록 개조한 inducible expression system을 구축 (Tetracycline repressor 이용 등)하였다.

마. 광범위 병 저항성 형질전환 작물 개발 및 형질유전 검증과 종자개발

- 1) 병원균에 대한 저항성을 지니는 형질전환 작물 제조; 형질전환용 construct를 electroporation 방법을 이용하여 *Agrobacterium* 에 transfer 한 후에 그들이 *Agrobacterium* 에서 안정하게 존재하는지를 확인하였다. 이때 유전자의 확인은,

E. coli 에서 사용하고 있는 mini prep 방법과 동일한 방법으로 하여 plasmid DNA를 *Agrobacterium* 에서 분리하여 Southern blot hybridization 을 통하여 확인.

- 2) 형질전환용 유전자의 도입확인; 우리가 원하는 gene 이 도입되었는지에 대한 transgenic plant 들의 일차 확인은 kanamycin resistance 를 이용하고, 확인된 transgenic plant의 유전자가 안정하게 다음 세대에 전이되는지를 T1 generation 에서 다시 transformant를 재확인하였다. 이렇게 만들어진 transgenic plant 들이 transfer한 유전자를 가지고 있는지를 total genomic DNA 를 분리하여 Southern blot hybridization 에 의하여 확인하였다.
- 3) 형질전환 및 신기능 작물의 생성; 유전자 칩의 집단적 발현 분석은 병충해나 환경스트레스의 내성을 갖게되는 기작을 자극의 수용에서부터 신호전달, 단백질 상호작용, 최종내성 산물의 발현 조절 및 발현에 이르기까지 내성에 관련된 모든 유전자들을 집단적으로 monitoring할 수 있는 장점이 있다. 따라서 칩에 의해 분석된 유전자들 중, 내성에 관계되는 핵심 유전자를 선별할 수 있을 뿐만 아니라 상호작용을 통해서만 역할을 수행할 수 있는 유전자군을 분리하였다. 이들 핵심 유전자 혹은 유전자 집단을 형질전환 시킴으로서 내성 형질전환체의 생성에 효율을 기할 수 있으며 지금까지의 형질전환체에 비해 훨씬 강력한 신기능 작물 개발을 위한 전략을 제공할 수 있다.
- 4) 농업적 응용 방법; 생물농약에 의해 발현이 유도되는 유전자 집단을 칩에 의해 분석하고, 이들 유전자들을 효과적으로 발현시킬 수 있는 생물농약의 개량과 식물병리학자들이 일반 경작지에서 진단용 혹은 분석용으로 흔히 사용할 수 있는 칩을 개발하고자 하였다. 지금까지 육종가들은 식물의 형질을 phenotype의 분석에 의존해 왔고 한 형질을 분석하는데 많은 시간과 노력이 요구되었으므로 육종 분야에 있어서도 매우 유용하게 사용될 것 칩을 개발하고자 하였다.

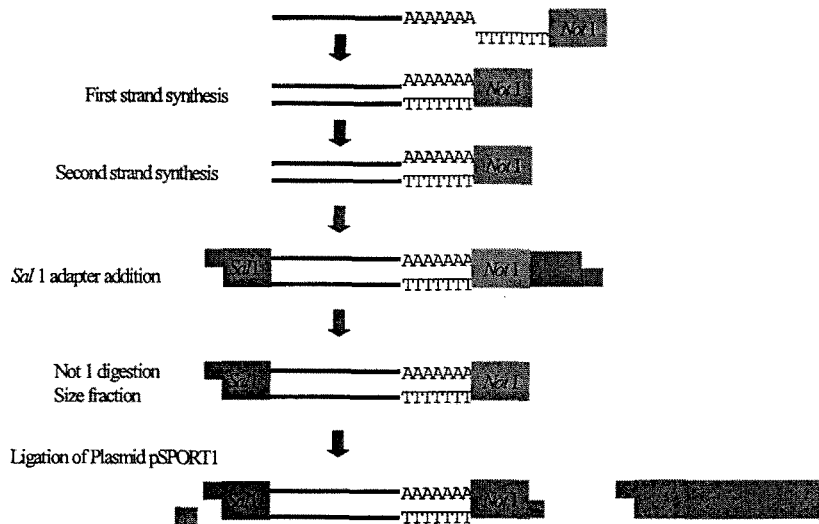
2절. 연구내용 및 결과

가. 유전자 칩 제작을 위한 유용 식물 유전자의 대량분리 및 유전정보의 D/B 화

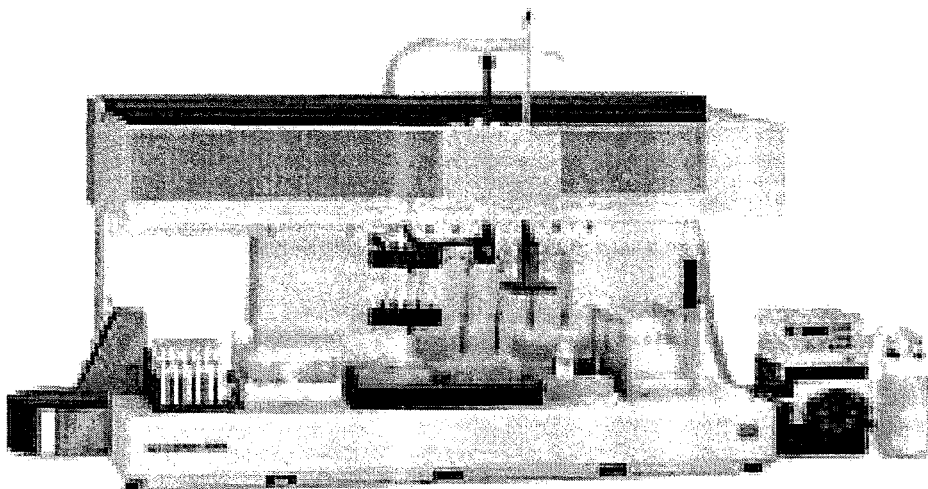
1) 배추 유전자 자원의 대량 확보; 유전자 칩 제작을 위하여 EST (expressed sequence tags) 유전자를 대량으로 발굴, 확보하고자 하였다. 이를 위하여 EST생성에 적합한 cDNA library를 구축하였는데 이것은 plasmid-based library로서 그림

3A와 같은 방법으로 구축하였다. 본 연구에서는 구축된 cDNA library로부터 무작위적으로 clones을 선택하고 선발한 E. coli colony로부터 빠른 시간에 순수한 plasmids의 대량분리가 가능한 Bio-Robot 3000 (그림 3B)을 사용하여 plasmids를 순리하였고 분리한 DNA들을 automatic DNA sequencer에 의해 sequencing을 수행하였다.

(A)



(B)



<그림 3. SuperScript™ Plasmid System을 이용한 cDNA library 구축 전략

(A) 및 유전자의 대량분리 로봇, Bio-Robot 3000 ; 2001년 5월 구입,
사용중(B)>

2) 분리한 유전자원의 유전정보 D/B 화: 결정한 유전자원의 염기서열을 결정하고 DNA sequences는 인터넷을 통한 데이터 베이스 (GenBank/ EMBL, Swiss-plot, PIR, dbEST 등)를 사용하여 추정되는 유전자의 기능을 분류, 정리하고 염기서열은 국제 유전자 등록기구 (GenBank/EMBL, DDBJ)와 본 연구과제 수행의 일환으로 구축한 database에 저장하였다. 특히 cDNA microarray 연구에서는 소스가 되는 클론들을 생산 및 관리하는 과정에서 모두 전산적인 도구들을 자체 시스템구축으로 관리하고 있으며 인터넷에 배추 유전자 은행으로 open 하여 유전자를 보관, 관리하고 유용유전자들을 관심있는 국내외 연구자들에게 분양하고 있다.

나. 식물 유전자 칩의 제작

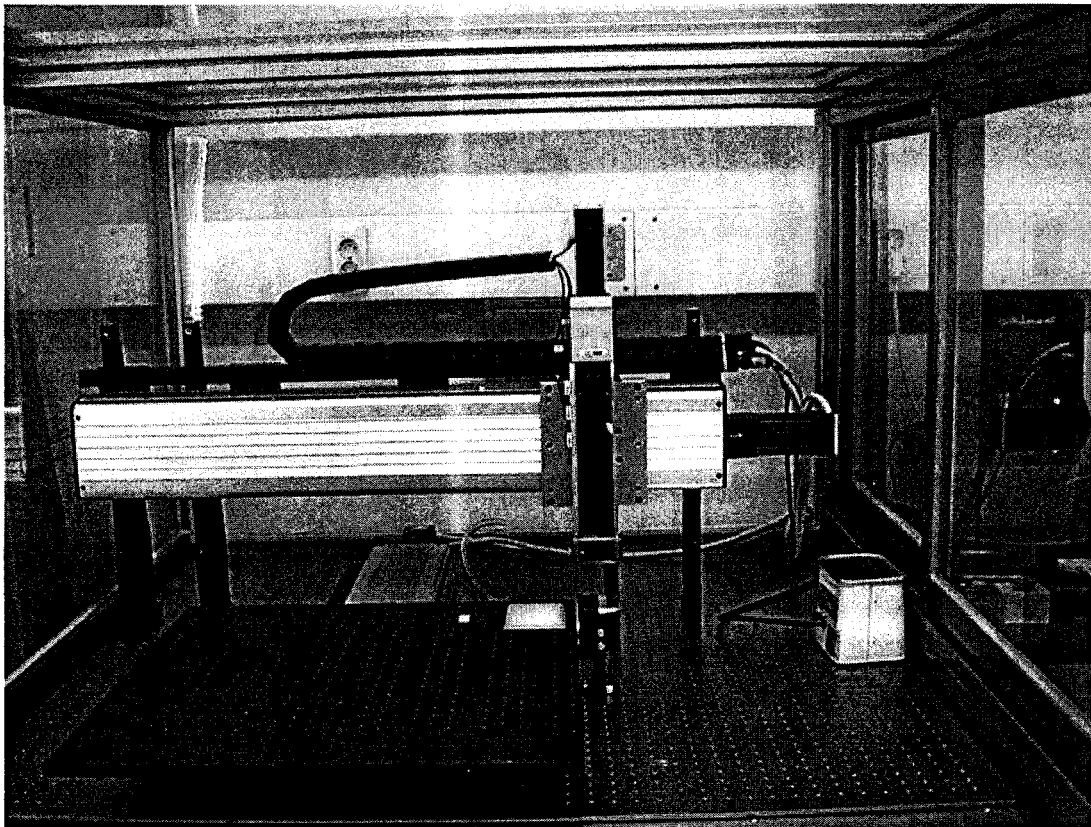
DNA 칩의 개발과 분석에는 크게 3단계의 제작과정, 즉 microarray system 구축, 유전자원의 고순도 증폭, DNA chip 제작과 분석과정이 요구되며 이들 과정을 세분화하여 정리하면 다음과 같다.

1) Microarray system 구축

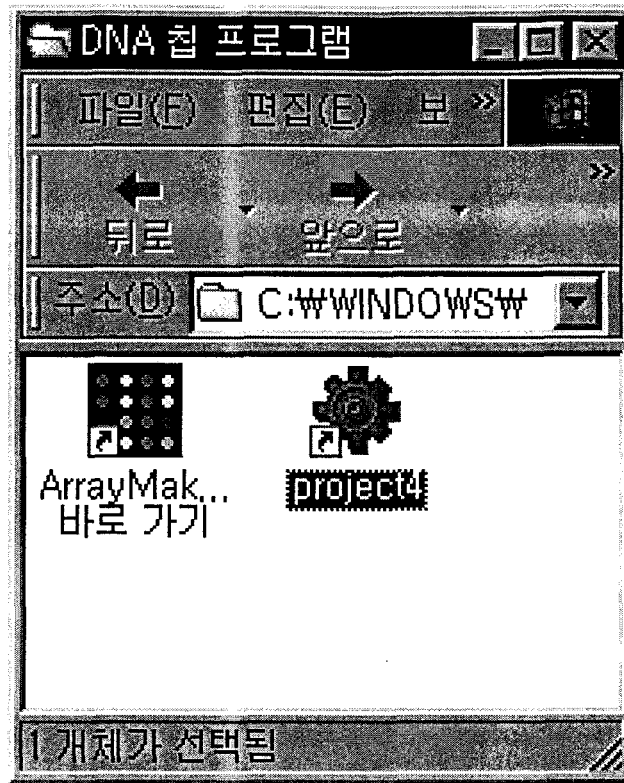
① Microarray의 운용체계 구축: DNA chip 개발에 가장 핵심적인 요소는 대량의 유전자원을 일정한 공간에 고밀도로 집적시키는 기술이다. 칩 제조기 제작에 관련된 부품으로는 X-, Y-, Z-축을 통하여 특정 물질을 다른 위치로 운반하는 servo motor, controller system, 제어장치와 이를 구동시키는 computer software가 있다. 본 연구에서는 microarray 제작을 위해 Stanford 대학의 P. Brown에 의한 3차원적 시료채취에 관련된 부품과 robotic 제어 관련 컴퓨터 보드(board), 기타 microarray 제작에 관련된 전 부품을 구입, 조립하였다. 핵심 부품으로서 Daedal Parker사의 3axis-linear controller system을 별도 구입하고, mounting에 필요한 진동 방진판은 Newport Co.에서 구입하였다. 이들은 4 x 4 feet의 플랫폼을 갖는 항진판 위에 3축 직교 구동축을 부착한 것이다. 전자부품의 배선은 manual에 의해 연결되었고, 각 축마다 이동거리를 제한 할 수 있는 limit 스위치 세 개를 부착하고 각각을 DMC-1730 motion controller에 연결하였다. 작동 시 오작동에 의한 기기의 파손을 막기 위해 emergency stop button을 부착하였다. Compumotor TQ10 servo amplifier로 linear slide motor를 구동하는데 이는 AC를 DC 형태로 바꾸어주며,

고전류로 60w power를 내어 강력한 구동력을 부여하였다. Printing pin은 Telechem사의 Stealth pin SMP7 (<http://www.arrayit.com>)을 구입하였고 100 μ m에서 150 μ m의 스팟 크기를 갖는 Z-bracket의 printer head안에 삽입되었다. 최대 32 개의 pin 삽입이 가능하며 5 만개의 유전자를 슬라이드 유리에 집적할 수 있게 설계하였다. 유전자 칩 제작에 있어 각각의 sample을 채취한 후 washing과 건조 (pin drying)가 필요한데 이는 sonicator washer system을 채택하고, dry system으로는 GAST사의 air pump를 설치하는 것으로 설계하였다. 완성된 유전자 칩 제조기는 제작되는 칩이 먼지로부터 오염되는 것을 방지하고, 온도, 습도를 일정하게 유지할 수 있게 유리 상자를 제작하여 설치하였다. 따라서 본 연구에서는 Stanford 대학에서 개발한 ArrayMaker v1.8.1를 구입하고 BioRobotics사의 TAS Gride II를 구동하기 위한 TAS/Pro의 software 운용방법을 습득하여 최적조건을 확립하였다 (그림 4A). Microarrayer 구동을 위해 PC-windows system에 사용되는 프로그램을 그림과 같이 내장 시켰다 (그림 4B).

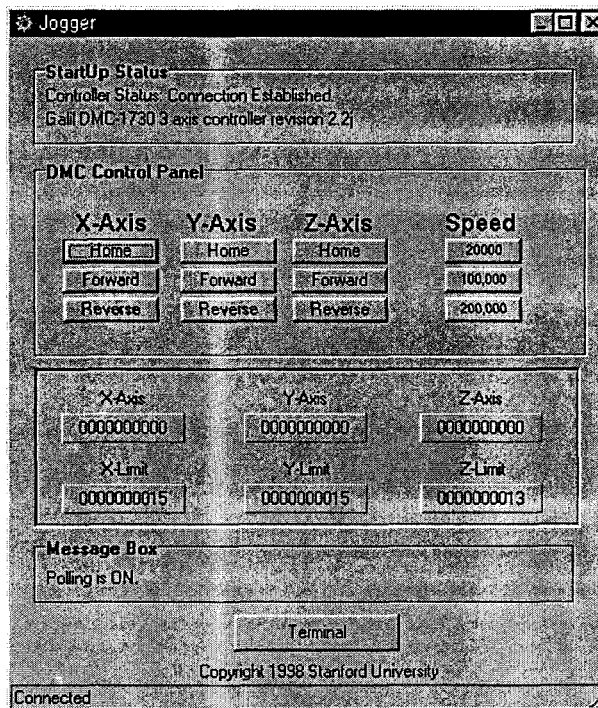
(A)



(B)



(C)

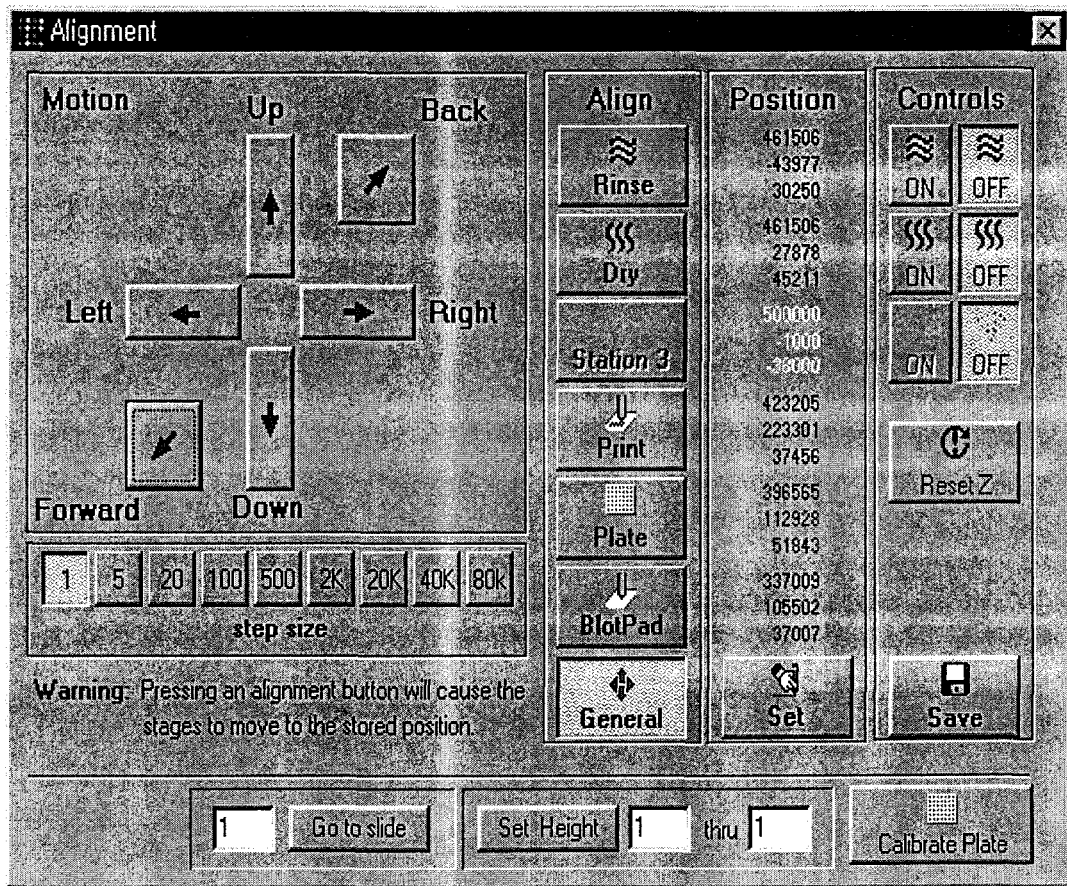


<그림 4. 조립 제작된 microarrayer "PioneerRedoh" 및 운용program Project4>

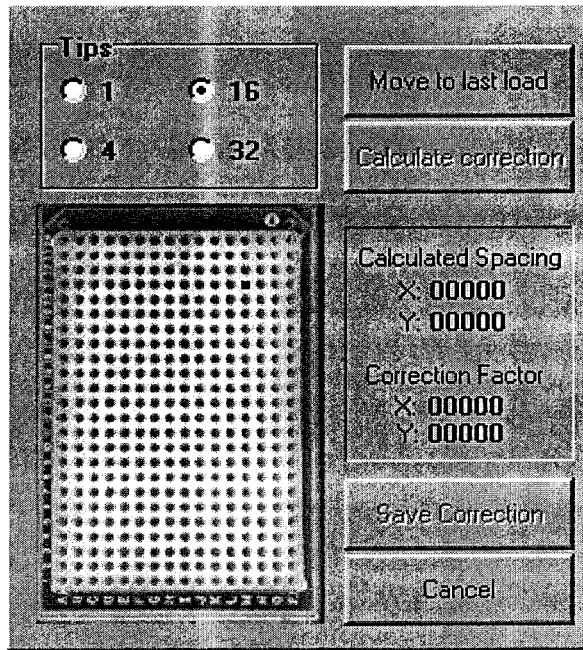
② Microarrayer 구동 program의 운용체계 최적화; Jogger program (Project4)은

기기 제작시 X-, Y-, Z-limit switch가 작동 하는지, linear encoder가 작동하는지를 점검할 수 있게 해준다 (그림 5). 그리고 ArrayMaker 1.8 는 복잡한 여러 모터 구동 및 작동 거리, 위치, 속도 등을 조절하는 핵심 프로그램이다. 이 프로그램은 기기 작동 초기에 동일한 위치에서 sampling을 해주기 위해 x,y,z-setting을 하는 것으로 시작되며 이후에 print head 와 plate, sonicator, dry station의 위치를 조절하는 align기능을 하였다. X-,Y-,Z-축을 위치에 맞도록 조정하는 것으로 좌측 화살표를 누름으로 sample plate 에 printing pin이 어디에 위치하며, 어느 높이에 와야 하는지를 보정해 준다. 초음파 세척 및 진공 건조에도 각기 시간을 조정했다 (그림 5A). 384 plate의 well 간 간격이 4.5mm 가 되는 것이 일반적이나 제품마다 간극이 맞지 않는 경향이 있으므로 'calibrate plate'를 작동하여 시작 지점과 마지막 지점의 sample well 에 pin을 간극을 맞도록 하였다 (그림 5B).

A)

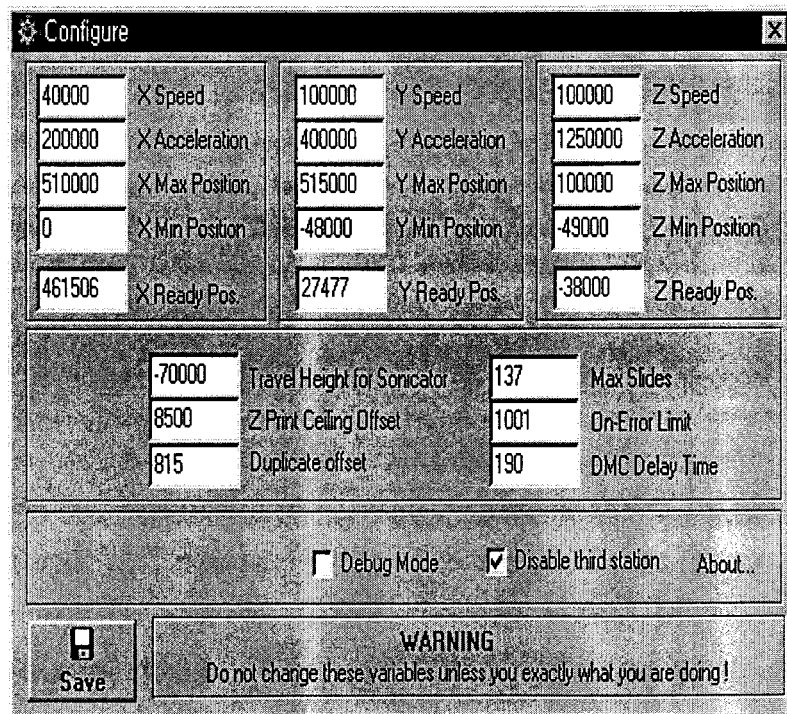


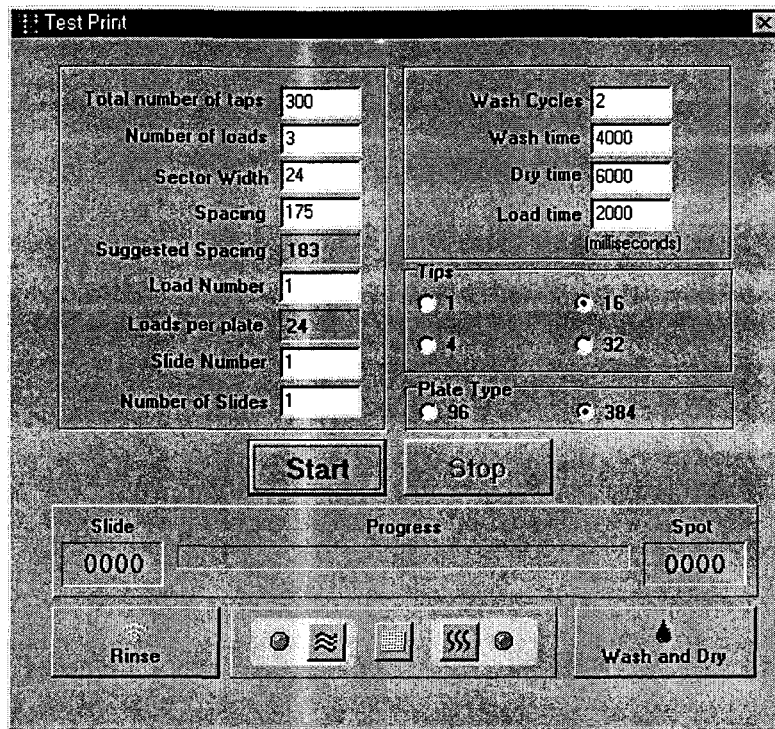
B)



<그림 5. 기기 조작 조정 화면과 sample plate 간극 보정 화면>

그림 6에서 보는 바와 같이 본 microarrayer는 각 축의 작동속도, 안전높이 등도 보정 가능하게 하였다.





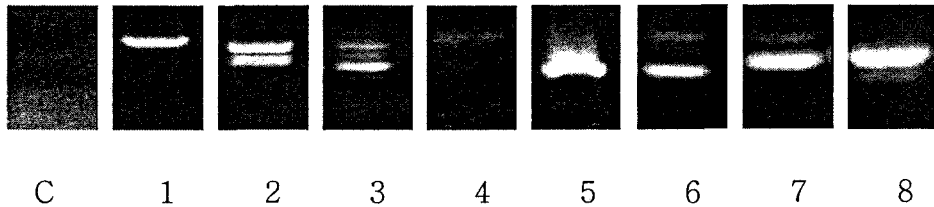
<그림 6. 축 작동 속도 높이 보정 및 Test printing 화면>

Test print에서 pin간 간극을 조정하고 1줄당 몇 개를 스폿하는지, 몇 줄을 스폿하는지를 설정하여 최종적으로 384 plate를 사용하여 real printing을 하였다. 본 기기로 16 pin을 사용 시 384 well 당 20분이 소요되었다.

③ Scanner 및 관련 software의 운용체계 구축; DNA chip의 화상 image를 분석하는 scanner로는 GSI사의 ScanArray™ Lite를 구입하였다. 화상분석은 Window NT system에서 구동되며, 화상 scan은 ScanArray ver. 3.0을 운용하였다. 본 분석방법은 Cy3 (녹색형광)와 Cy5 (적색형광)를 각각 구분하여 분석하는 laser detector system이며, CCD 카메라 형식의 화상분석에 비해 보다 정밀한 값을 얻을 수 있는 것으로 판단된다. DNA microarray는 매우 다양한 전산 및 통계적인 문제들을 수반하게 되며, DNA 칩 생산에서부터 최종적으로 이를 사용하여 발현 분석 과정에 걸쳐 컴퓨터가 필수적인 도구로서 사용된다. 화상 분석된 data는 QuantArray ver. 3.0 program을 구동하여 Cy3와 Cy5값을 합성시키고 이들을 새로운 값하여 정량 분석하였다. 정량적 data는 Excel data로 표시될 수 있으며, 이것을 바탕으로 Log2, scatter plot, self-organizing map (SOM; <http://genome-www5.stanford.edu/MicroArray/SMD/restech>), hierarchical clustering을 수행하여 expression profiling 하였다.

2) 유전자의 대량확보 및 고순도 유전자원의 증폭

① 유전자의 증폭: 칩 제작용 고순도의 EST 유전자의 증폭은 PCR 방법을 사용하였다. 이때, 그림 7의 1과 같이 단일 DNA 생성물을 얻는 것이 매우 중요하며, 복합 DNA band를 보이는 것에 한하여 다양한 PCR 조건 및 primer 염기서열 구성을 조절하였다.



<그림 7. 칩 제작용 유전자 증폭 시 발생하는 PCR 생성물 형태>

총 100 μ l의 PCR 생성물 중, 5 μ l는 그림 4과 같이 단일 생성물 및 총 생성물의 정량에 사용하고 lane 1과 같이 단일 생성물일 경우, 에탄올 침전을 통해 정제하여 보관하고 원하는 수와 양의 유전자를 확보한 후에 DNA chip 제작에 이용하였다.

② 유전자 칩 제조를 위한 유전자 증폭의 최적조건: 유전자 칩 제조를 위하여 최종 확립된 유전자의 증폭을 위한 PCR 조건은 표 4과 같다.

<표4. PCR 반응조건과 PCR cycle>

	Flower bud	Root tip, Etiolated
DNA	1 μ l (2 ng/ μ l)	1 μ l (2ng/ μ l)
Primer 1	T7(N)-2 μ l(10 pmol)	SP6(N)-2 μ l(10 pmol)
Primer 2	T3(N)-2 μ l(10 pmol)	T3(N)-2 μ l 10 pmol)
dNTP	2 μ l (10 mM)	2 μ l (10 mM)
Polymerase	0.2 μ l (10 unit/ μ l)	0.2 μ l (10 unit/ μ l)
ddH ₂ O	82.8 μ l	82.8 μ l
Buffer	10 μ l (10 \times)	10 μ l (10 \times)
Total	100 μ l	100 μ l

Cycles	Temp / time
1 cycle	94 °C / 2 min
30 cycles	94 °C/30 sec, 57 °C/30 sec, 72 °C/1min10 sec
1 cycle	72 °C / 10 min
1 cycle	4 °C hold to end

3) 유전자 칩 제조의 최적조건 확립과 배추유전자 칩 제작

① 칩 제작의 최적조건 확립; 유전자 칩 제작을 위한 DNA spotting에서 요구되는 parameter로는 Pin printing factors (Mechanical variations, Effective pre-printing, DNA spotting solution) 와 Post-printing factors (Washing/cross-linking/Blocking, Hybridization)등이 중요 factor로 작용하며 이들 조건을 최적화하는 것이 우수한 칩 제작에 중요한 변수로 작용하였다. 이외에도 유전자 칩 제작에 영향을 주는 요인들은 유전자 칩 제작온도, 습도 등의 환경적 요인과 칩에 부착할 유전자의 denaturation, 유전자 시료의 양, 칩에 부착 후 cross-linking 조건 등도 영향을 주기 때문에 이들 요인들의 최적화에 상당한 시간과 노력을 투자하여 유전자 칩 제작조건을 표준화하였다.

② 유전자 칩 발현 분석을 위한 mRNA 분리 및 probe-labeling과 형광 detection 조건; 최근 형광물질을 이용한 DNA 또는 RNA labeling과 laser를 이용한 검색 기법이 꾸준히 발전함으로써 이 방법을 사용하여 각각의 sample을 각기 다른 형광으로 표시할 수 있다. 즉 두 개의 다른 환경에서 얻은 세포들로부터 total RNA 또는 mRNA를 추출한 뒤 이들 mRNA를 reverse transcription시킬 때 각각 다른 색깔의 형광 물질을 띤 염기를 첨가하여 빨간색 (Cy5)이나 녹색 (Cy3)을 띤 cDNA를 합성하였다. 본 실험에서 설정한 probe 제조과정에 대한 최적조건은 다음과 같다 (표 5).

○ RNA 추출과정; 약 6g의 시료를 액체질소를 넣고 분쇄한 후, 50 ml 튜브에 옮겨 RNA 추출 buffer 18 ml를 넣고 흔들어준다. 9 ml의 페놀을 넣어서 15분 동안 강하게 혼합하는 것을 2회 반복하였다. 4,500 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 상층액을 새 튜브로 옮긴 후, 9 ml의 클로로포름을 2회 처리해 준다. 4,500 rpm에서 15분 동안 원심분리 한 상층액을 15 ml씩 분치 한 후, 6M의 LiCl를 같은 부피로 넣고 하루동안 4 °C에 놓아둔다. 4 °C, 9,000 rpm에서 20분동안 원심분리 한 후 2.5 ml의

증류수에 녹인 다음 실온에서 60분 동안 100% 에탄올과 3M sodium acetate를 넣고 침전시킨다. 16 °C에서 9,000 rpm으로 20분 동안 원심 분리한 후에, 70% 에탄올로 5분 동안 씻어준다. 공기 중에서 말린 다음 500 μ l의 3차 증류수에 녹인다. OD_{260/280}를 측정한 후 -20 °C에 저장하였다.

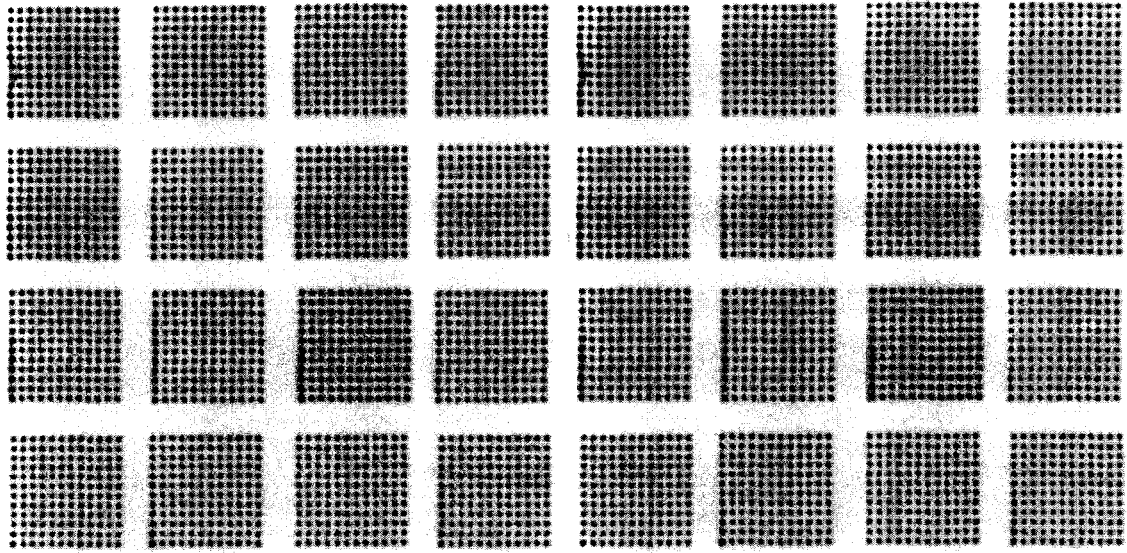
○ 역전사 반응과 정제: 표 2와 같이 PCR 튜브내의 반응조건으로 70 °C에서 10분 동안 두었다가, 즉시 얼음으로 옮긴다. 이것을 cDNA 합성용액에서 42 °C에 1시간 동안 반응시킨다. 반응용액에 5 μ l의 0.5 M EDTA를 넣고 잘 섞어준 다음, 10 μ l의 1 N NaOH 넣고 65 °C에 10분간 둔다. 그리고 25 μ l의 1 M Tris (pH 7.5) 넣고 잘 섞어준다. Microcon YM-100 column을 사용하여 정제하였다. 2.5배의 100% 에탄올과 0.1배의 3M sodium acetate 넣은 뒤, -70 °C에 20분간 놓아둔다. 4 °C에서 12,000 rpm으로 20분간 원심 분리한 뒤에, 70% 에탄올로 씻어준다. 반응액을 30 μ l의 hybridization solution에 녹여서 유전자 칩과 반응시킨다.

<표 5. 역전사 반응액과 반응조건>

RNA(~100 μ g의 total RNA)	X μ l
Oligo-dT-V(2 μ g/ μ l)	0.5 ~ 1 μ l
DEPC-water	Y μ l
Total volume	20.5 μ l

5 \times superscript buffer	8 μ l
0.1M DTT	4 μ l
RNAse inhibitor (15 u/ μ l)	2 μ l
Cy3-dUTP or Cy5-dUTP	3 μ l
dNTP(25 mM, dTTP-10 mM)	1 μ l
Superscript II reversetranscriptase	1.5 μ l
Total volume	40 μ l

③ 유전자 칩의 제작: FAST (S&S) slide를 사용하여 test를 위하여 ink를 spotting한 array 결과는 그림 8과 같으며 다양한 조건에서 spotting을 최적화하여 spot condition을 확립하였다. Super aldehyde glass에 spotting할 때 현재 보다 2배의 양을 스팟할 수 있고 16 핀 사용시 144x16=2184 grid, 32 핀 시 4364 grid, 24x24 grid일 경우 18432 스팟 array 제조가 가능하며 직경 80 μ m pin 사용시 30x30x32=28800 스팟 grid microarray 가능하다.



< 그림 8. 12 x 12 / per block으로 ink를 사용한 array 결과 >

고 순도로 증폭, 정제된 3,074개의 clone들을 16-pin system으로 이루어진 arrayer의 X, Y, Z축을 정밀하게 조절함으로 각각의 spot이 최적 조건으로 spotting 될 수 있는 조건으로 PioneerRedoh를 사용하여 확립한 최적조건 (표 6)에서 배추 유전자 3,200개가 장착된 유전자 chip을 제작(이름: BC-EST ver 1.01로 명명)하였다.

< 표 6. 유전자 칩 제작을 위한 최적화 시킨 조건 >

최적화 내용	실험내용	표준화 내용
칩 제작 습도환경	40, 50, 60, 80%	60%
칩 제작 온도환경	20 - 37 °C	22 °C
DNA cross-linking	UV, 80°C Baking	UV
칩 유전자 변성	70% formamide, Boiling	5분간 boiling
384 Plate	square/round well type, Genetix/Corning, Polypropylene/styrene	Square type Genetix Polystyrene
Sample Vol.	5, 10, 15, 20, 25 μ l in spotting solution	14 μ l
Pre-printing	5, 10, 15	10
Pin type	Stealth SM-4B, BioRobitic TAS pin	Stealth SM-4B

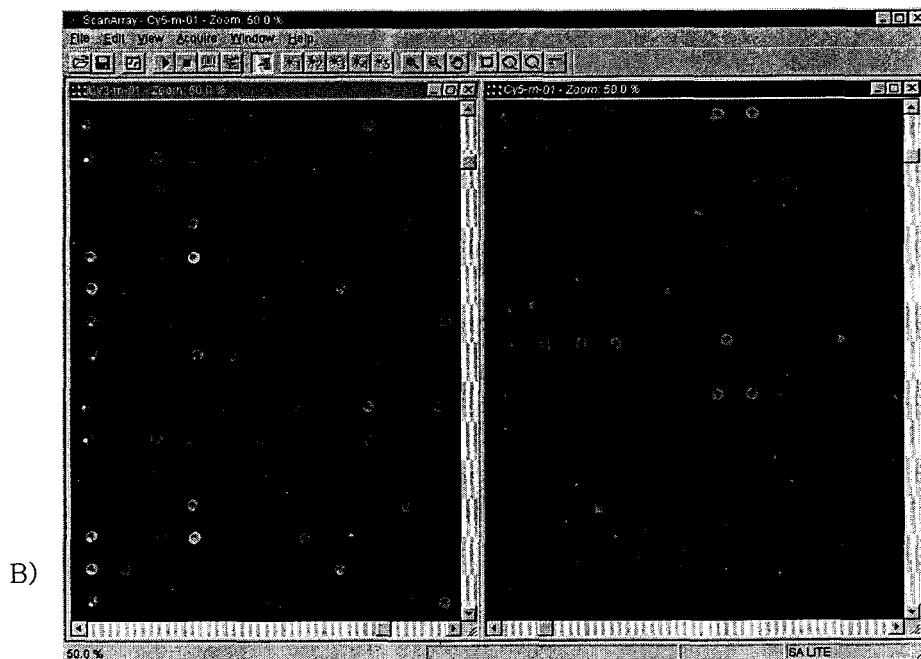
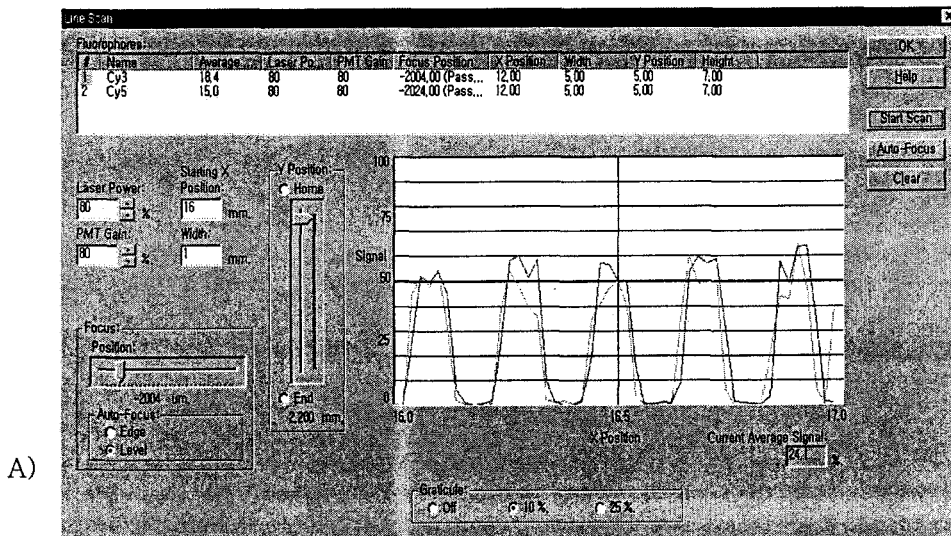
④ Chip의 생성 및 보관: 3,200여개의 clones이 array된 slide는 16시간 동안 먼지가 없는 chamber내에서 건조되었다. 여기에 0.2%SDS를 처리하여 non-bound DNA를 제거하고, 95℃에서 변성시킨 후에 sodium borohydride로 free aldehyde를 최소화하였다. Spotting후, 유전자 칩은 UV를 쬐어 cDNA를 slide에 고정시킨 다음 하루이상 실온에서 말린다. 0.2% SDS로 non-bound DNA를 제거한 다음, 3차 증류수로 2회 씻어 주고 95℃로 끓여 DNA를 denaturation 시킨다. 800 rpm에서 간단히 물기를 제거한 다음, sodium borohydride solution으로 free aldehydes를 제거하였다. 0.2% SDS와 3차 증류수로 각각 1회 씻어준 다음, 800rpm에서 5분 동안 말려준다. 실온에서 빛을 차단하여 저장하였다 (1달이상 저장가능)

⑤ Probe와 유전자 칩과의 prehybridization 및 hybridization: DNA chip slide에 prehybridization buffer (6 XSSC, 0.2% SDS, 5 X Denhardt solution, 1 mg/ml salmon sperm DNA) 15 μ l를 넣고, cover slip을 덮은 후 hybridization chamber에 넣어 2시간 동안 상온에 둔다. 2 X SSC와 0.2% SDS로 2분간 적시고 spin으로 말린다 (prehybridization). Probe (Cy3-Cy5)에 hybridization solution (6 X SSC, 0.2% SDS, 5 X Denhardt solution, 0.1 mg/ml salmon sperm DNA) 15 μ l를 넣고 섞은 다음, 95℃에서 90초 동안 끓인 다음, 재빨리 얼음에 둔다. 2분 동안 최대 rpm으로 원심 분리한 다음 상층액 약 28 μ l를 slide위에 떨어뜨린다. Cover glass를 덮은 후, 400 μ l의 2 XSSC를 뿌린 Kimwipes와 같이 50 ml tube에 넣은 다음 hybridization chamber에 넣어서 빛이 안 들어가게 하여 65℃에서 14~16시간 incubation하였다. 이후 2 X SSC, 0.2% SDS로 60℃에서 30분간 2회 씻고, 0.05 X SSC로 5분간 씻은 다음, spin으로 말려서 scan하였다.

다. 유전자 칩의 발현분석

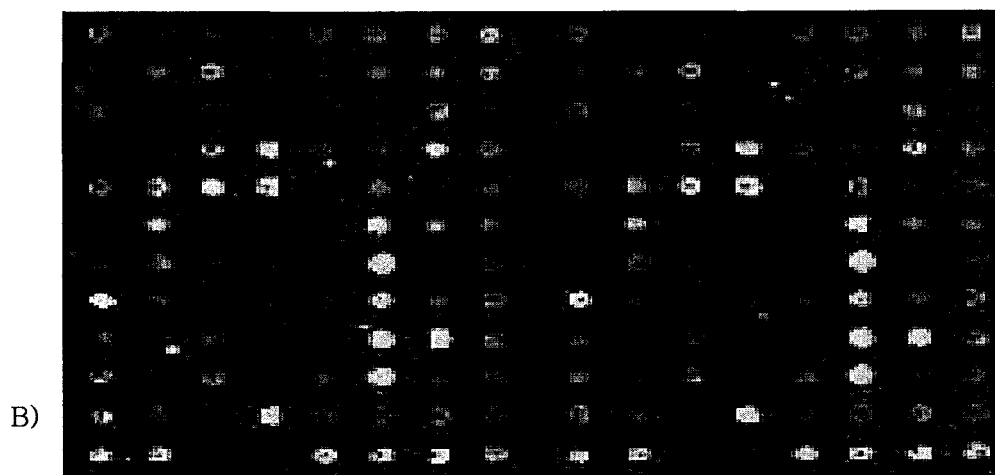
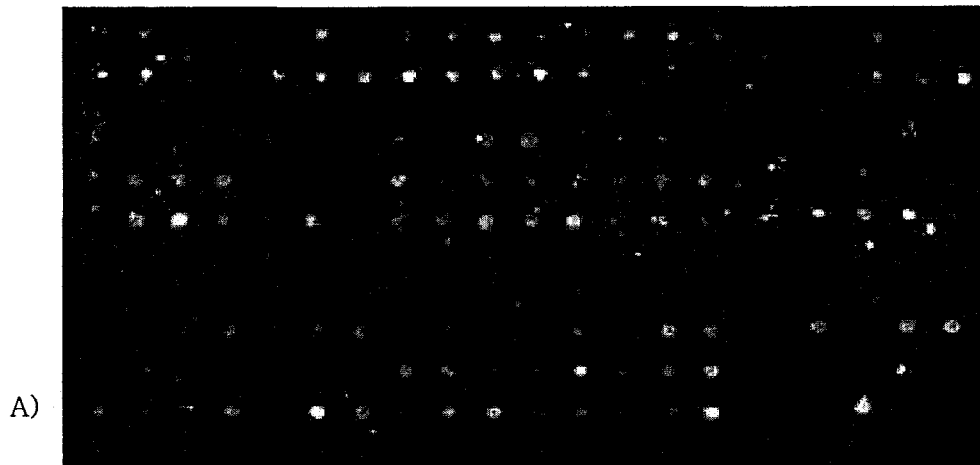
1) **Scanner 분석조건 최적화:** Hybridization이 끝난 후에 scan-array를 통하여 data image를 얻기 위해서는 간단한 protocol을 작성해야 하였다. 먼저 spot이 위치한 지역을 설정해 주고, 실험에 사용된 형광물질을 선택한 다음 해상도를 선택하였다. 처음에는 quick scan으로 scan한 후에 spot의 정확한 위치와 초점을 맞춘 다음 해상도를 높여서 scan하였다. Spot의 위치나 초점을 조절하는 작업은 auto-range, auto-focus 기능을 사용하여 최적화 할 수 있다. Auto-focus 기능을 사용하기 위해서는 quick scan된 image에서 spot을 선택하여 line scan을 해주어야 하였다. 그림 9A 은 line scan을 한 화면으로 여기에서 laser power, PMT value, focus를 조절하여 최상의 signal을 얻을 수 있는 상태를 만들어 준다. 그러나 한가

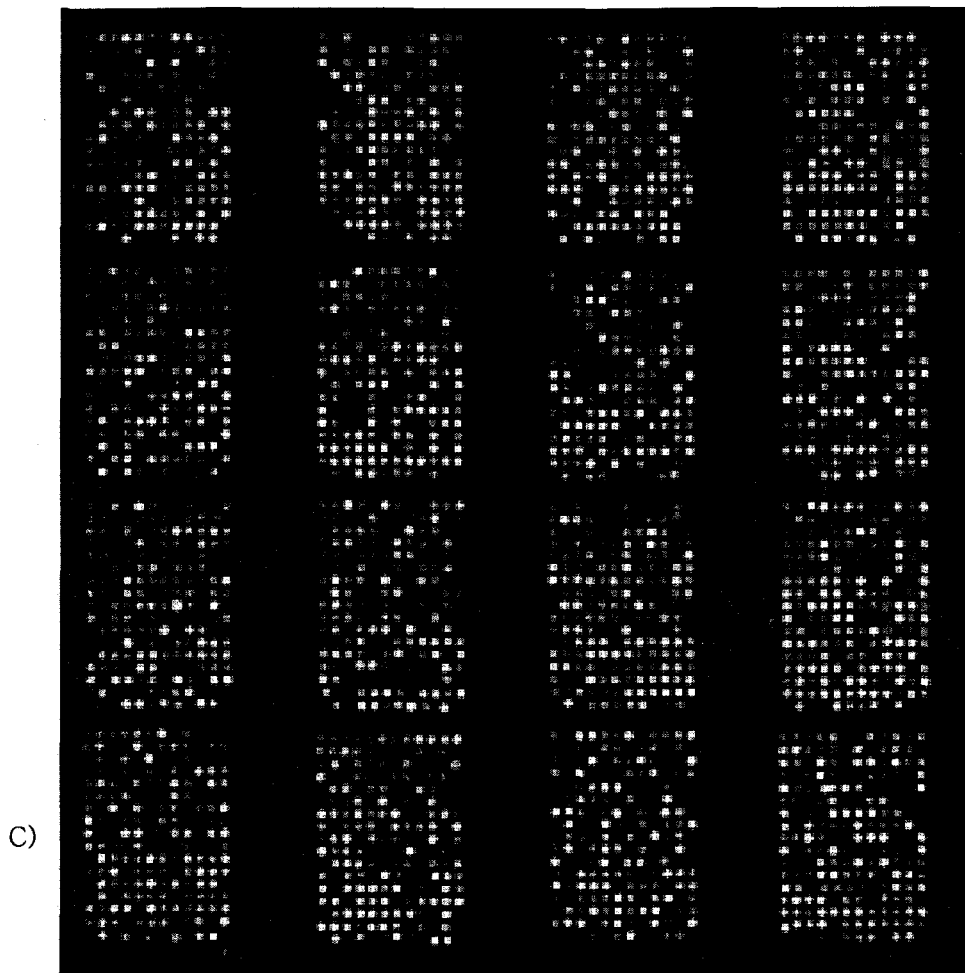
지 고려할 점은 Cy5의 intensity가 Cy3보다 약 1.5배 높다는 것이다. 그러므로 임의의 spot을 line scan하는 것보다는 house keeping gene같은 것을 선정하여 Cy5와 Cy3의 intensity를 같게 맞추어 normalization을 시켜주는 것이 좋다. Protocol을 완성한 후에 다시 scan을 하면 그림 9B와 같은 image를 얻을 수가 있다. Scan된 image는 흑백이지만, 여기에 Cy3, Cy5의 파장에 맞는 색을 입혀 보여지게 된다. Cy3를 green으로, Cy5를 red로 하는 것이 일반적이지만, 연구자에 따라 다른 색으로 바꾸어 볼 수도 있다.



< 그림 9. Laser power, focus, PMT value 등의 조정(A) 및 Scan image (B) >

2) Salicylic acid와 sodium chloride를 처리한 배추 유전자 칩의 scanning 결과: 그림 10은 배추에 1mM의 salicylic acid와 100mM의 sodium chloride를 각각 2시간 동안 처리한 시료의 유전자 칩에 의한 발현분석결과를 나타낸 것이다. Salicylic acid를 처리한 시료에 Cy3를, sodium chloride를 처리한 시료에 Cy5를 표지하였다.

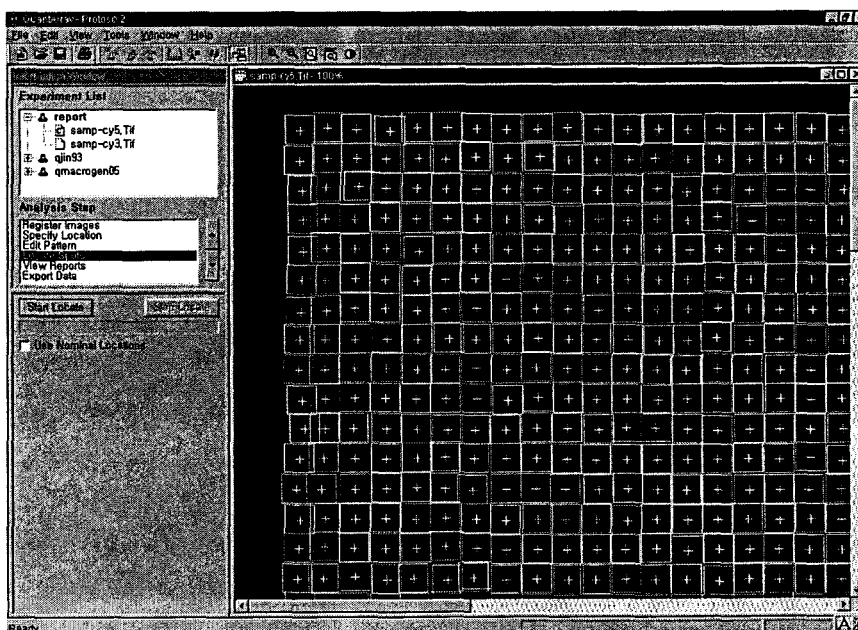
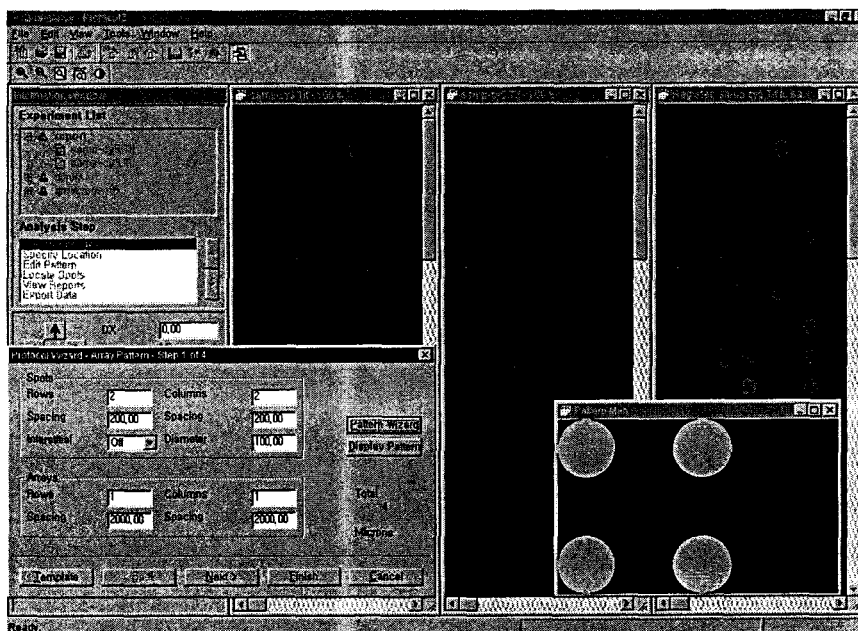




<그림 10. Gene expression profile from when treated SA(A) and NaCl (B),
BC-EST ver 1.01 칩을 이용한 춘화처리 유전자의 발현분석 결과(C)>

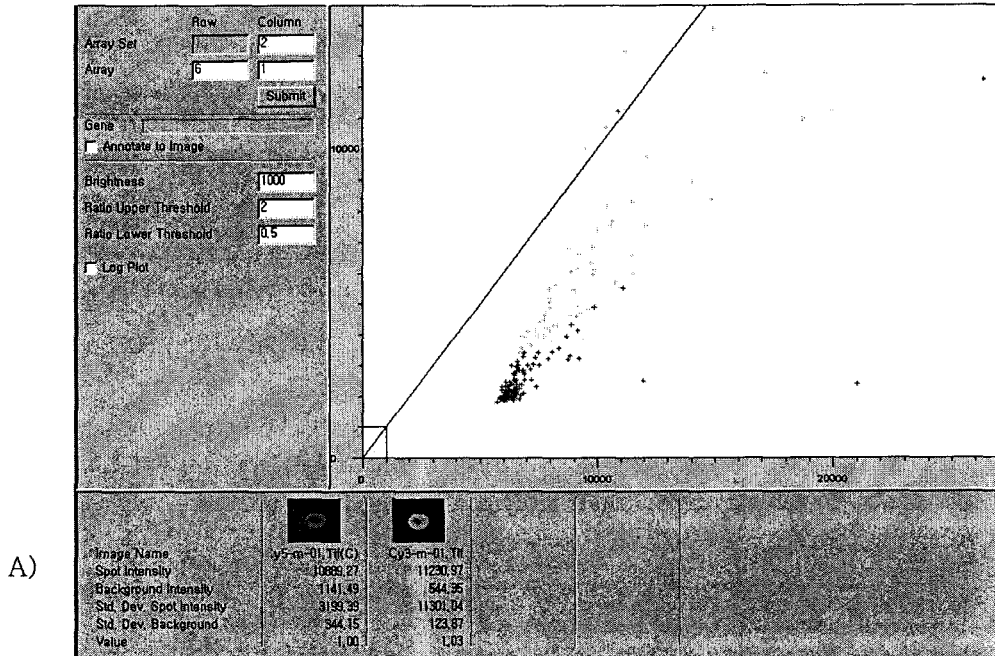
그림 9A는 초기실험 data로 spot 모양이 불규칙하고 intensity도 매우 낮았으나 그림 9B는 최근에 얻어진 data로 실험의 조건이 최적화되었음을 알 수 있다. 이렇게 얻어진 data는 quantarray를 통하여 spot간의 intensity를 비교 분석하고 수치화하게 된다. Scanarray와 마찬가지로 quantarray 또한 image분석을 위하여 protocol을 작성하여야 하였다. 실험의 scale을 정해주고 spot의 정확한 intensity를 얻기 위해 꼭 필요하다. 그림 11과 12는 Quantarray의 분석 과정으로 정확한 spot의 intensity를 측정하기 위하여 spot의 위치를 지정해 주는 것으로 수동 또는 자동으로 할 수 있다. 모든 분석의 단계가 끝나면 4가지의 형태로 data를 볼 수 있다 (Scatter plot, bar graph, threshold report, statistics report). 이 중에서 가장 잘 알려진 것이 scatter plot이다. Scatter plot은 2차원 상에 유전자의 발현 정도를 나타낸 것으로, 각각의 유전자의 발현 정도를 한 눈에 볼 수 있다. 평면상의

spot을 지정하게 되면 해당하는 유전자의 정보가 아래에 나타나게 된다. 그림 13A는 본 연구팀에 의해 얻어진 data를 scatter plot으로 나타낸 것이다. 이러한 실험은 일련의 DNA chip의 과정을 최적화하기 위하여 수행된 것으로 유전자의 발현 pattern에는 큰 의미를 두지 않았다.



<그림 11 & 12. Quantarray의 protocol 작성화면, Spot의 위치를 지정하는 화면>
 최종적으로 분석된 data는 excel sheet나 text file로 수치화하여 저장 할 수 있

다. Spot intensity, background intensity, Cy3/Cy5 ratio, gene name 등의 실험에 대한 정보를 담고 있다. 그림 13B는 data를 excel sheet로 출력하여 본 것이다.



B)

Array Number	Array Row	Array Column	Row	Column	Name	X Location	Y Location	ch1 Intensi	ch1 Backgr	ch1 Intensi	ch1 Backgr	ch2 Intensi	ch2
2438	1	1	1	1		780	520	305.8842	214.7483	57.65247	34.48403	265.3526	79.0
2440	2	1	1	2		1110	490	4671.547	234.3878	959.2456	38.53702	2826.847	104
2442	3	1	1	3		1450	510	17499.13	332.5986	603.0992	63.92083	14655.3	160
2443	4	1	1	4		1850	530	1060.49	232.9932	423.4803	35.01418	2769.226	82.0
2444	5	1	1	5		2170	490	885.4579	234.8299	296.2801	36.38368	1249.879	67.3
2445	6	1	1	6		2530	490	996.3052	215.2789	480.8243	27.10653	786.2789	69.
2446	7	1	1	7		2890	500	2091.518	220.0612	449.3155	36.0679	3632.921	88
2447	8	1	1	8		3240	510	2641.184	265.9184	509.6567	35.26777	16543.76	12
2448	9	1	1	9		3610	510	4894.911	300.9932	1070.474	36.1133	6228.884	12
2449	10	1	1	10		3960	490	4569.868	315.5102	730.637	42.54947	10835.31	146
2450	11	1	1	11		4330	510	5492.563	324.7687	603.8204	42.85753	13925.79	158
2451	12	1	1	12		4680	520	2516.247	317.1089	441.4604	40.05581	6723.526	194
2452	13	1	1	13		5050	510	21402.22	587.6395	625.7535	100.5114	9164.205	24
2453	14	1	1	14		5390	520	5963.248	352.7823	1492.811	40.86388	8262.031	186
2454	15	1	1	15		5770	510	21364.07	451.585	551.754	82.89437	9534.727	231
2455	16	1	1	16		6110	510	17657.43	400.4354	1680.341	61.74251	20839.15	255
2456	17	1	1	17		6470	510	981.7474	384.9388	207.3202	44.34782	6315.689	167
2457	18	1	1	18		6850	510	15258.72	488.3878	1172.623	57.29047	11123.76	186
2458	19	1	1	19		7210	530	2997.595	383.5442	485.3718	54.49522	3565.49	147
2459	20	1	1	20		7560	520	829.9526	292.2313	235.0688	45.64876	1193.7	123
2460	21	1	1	21		7950	530	890.0737	254.8163	240.3804	35.46019	3308.184	123
2461	22	1	1	22		8300	530	412.2	257.2381	74.50948	39.07954	569.3316	128
2462	23	1	1	23		8650	530	1811.574	299.9864	434.3342	38.32557	4912.953	130
2463	24	1	1	24		9030	520	4755.978	534.8776	1228.187	78.95281	4183.021	140
2464	25	1	2	1		770	880	1045.8	215.2993	504.5241	38.27038	1489.874	86.3
2465	26	1	2	2		1100	850	1638.51	224.7483	450.7494	39.17188	2226.905	90.8
2466	27	1	2	3		1450	850	1068.5	250.4082	690.6265	44.08021	875.4158	84.2
2467	28	1	2	4		1800	850	1363.484	244.9184	346.4819	34.22178	3443.363	87.7
2468	29	1	2	5		2190	850	629.1316	224.866	200.7122	37.95228	438.721	82.4
2469	30	1	2	6		2510	860	685.8527	237.6463	874.6442	35.8615	438.221	85.1

<그림 13. Scatter plot : A, X축 - Cy5 (NaCl), Y축 - Cy3 (SA);
B, 수치화 된 data를 excel로 출력한 모습>

3) 유전자 칩에 의한 발현 데이터 분석 (Normalization 및 expression

profiling); DNA chip에 의한 유전자의 집단적 발현분석을 위한 data 분석에 있어서 중요한 점은 DNA microarray를 사용한 모든 과정에서 수반된 다양한 노이즈를 최소화하는 과정이다. 따라서 통계처리가 회피할 수 있는 부수적인 것이 아니라 신뢰할 수 있는 결과의 유추를 위해서는 필수적인 것이다. 이들을 효과적으로 분석하고 그 결과를 공유하고 저장하는 것이 중요한 요소가 된다. 현재 이러한 프로그램의 개발이 다양하게 이루어지고 있으며 그 결과들이 많은 database들과 연계되어 체계화 되어가고 있다. 개발된 program을 이용하여 background에서 유도된 noise를 최소화하고 처리에 의한 발현양을 분석하는 방법으로는 계층적 clustering, K-means clustering, SOM 등의 방법을 많이 사용하였다.

라. 유전자 칩 분석에 의한 신기능 유전자의 발굴 및 특성분석

1) 저온성 관련 유전자의 기능 연구 (Plant J. 25: 247, 2001 발표)

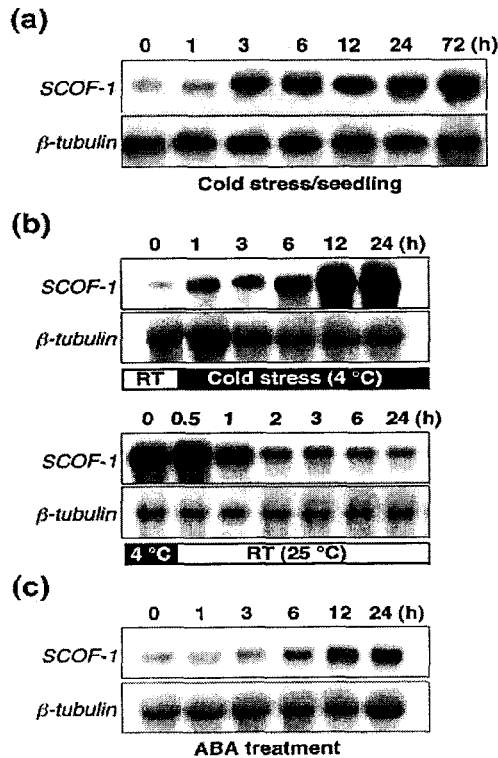
① Cold-stress 저항성 유전자의 염기서열 결정과 Scf-1의 유전자 발현; 저온처리에 의하여 증가되는 유전자를 분리하여 염기서열을 결정한 후, database에서 비교 분석한 결과 그림 14A와 같았으며 세포의 핵으로 targeting될 수 있는 domain과 2개의 zinc-finger domain을 함유하고 있음으로서 transcription factor로서의 기능을 수행할 것으로 유추할 수 있었다. 그림 14B에서 보는 바와 같이 Scf-1은 4°C에서 3시간 처리한 callus 시료에서 강하게 발현이 유도됨을 알 수 있었고, 72시간까지 처리하였을 경우에도 상당한 발현증가를 관찰할 수 있었다. 뿐만 아니라, 저온에서 24시간 처리한 시료를 25°C로 온도를 상승시켰을 경우에도 처리한 후 약 2시간 이내에 급격하게 유전자의 발현이 감소함을 관찰하였고 cold-stress signaling molecules인 ABA 호르몬에 의해 유전자의 발현이 강하게 증가되어 이 유전자는 cold-stress에 의해 강한 induction을 하였다는 사실을 확인할 수 있었다.

Comparison of SCOF-1 Amino Acid with Other Zinc Fingers

	HLH
SCOF-1	MALEALNSPTTAP-SFP---FD--DPTTP--M AKKRSKR R-DH--P
EPF2-7	MALEALNSPTTTPSF-QF--EDNGLXY-LEFWK GKRSKR RSRMRQC
EPF2-5a	MALEALNSPTAATP-LFPF-YEDQVDMNSLDSV GKRSKR R-ITTPF
EPF2-5b	MALEALNSPTAATP-SLFP-RYEDQVDMNSLDSV GKRSKR R-IZTTPF
EPF2-4	MTLETLS-TPNT--SKPTFLPKPINDALD-I AKKRSKR R-IZTTPF
consensus	MALEALNSPT..tP.s.F....ed..d...l..v. AKKRSKR ...e.PP
Zinc Finger I	
SCOF-1	SEEEYLALCLINLAR-QGTTIVNN-RIVS---PFLQFO-P---QPTDF
EPF2-7	TEEEYLALCLINLARSDGSVNRSL----PPFPLPFPVVTQINATL
EPF2-5a	DEEEYLALCLINLAR-QMG--TPSSIPGDTPTTIDKPEKRRDVP
EPF2-5b	SEEEYLALCLINLAR-QMG--TPGSTD-TTITTTISKEPEKRRILTP
EPF2-4	SEKYLALCLINLARSGGKHPITTP---TTTNRPLQVQEPINR--PLQV
consensus	eSEKYLALCLINLAR.S.G....tt.....t..p.....P.....
Zinc Finger I	
SCOF-1	S---TLSTVCSVCDKSFSTQALGCKKASRKLAG-A--AE-DQRZST
EPF2-7	LEQKEL--YVCSVCGKFGSTQALGCKKASRKLVSQEG---DEQSTTS
EPF2-5a	VYQETEQSYVCSVCDKSFSTQALGCKKASRKLITTIATYALDDNNRP
EPF2-5b	VYQETEQSYVCSVCDKSFSTQALGCKKASRKLITTIATYALDDNNRP
EPF2-4	QEPINQSYVCSVCDKSFSTQALGCKKASRKLITTIATYVYDPT--PF
consensus	..q.teqstVCSVCDKSFSTQALGCKKASRKL.....tt...Dg...np
Zinc Finger II	
SCOF-1	TTS-SAAATG---SAS--G-GNARFCSICRSPPTQALGCKKRVYEG
EPF2-7	TTFN-VYQTS---SANVNGNRTNRSICRKPPTQALGCKKRVYEG
EPF2-5a	TTNSITGRVNNISITL-NPSGRSIVCSICRKAFTQALGCKKRVYEG
EPF2-5b	TTNSITGRVNNISAL-NPSGRSIVCSICRKAFTQALGCKKRVYEG
EPF2-4	STNS-----L-NPSGRFVCSICRCPSSQALGCKKRVYEG
consensus	TTNS..gts....Ssl.NpsGr.RvCSICRKPPTQALGCKKRVYEG
SCOF-1	NGHGNH-N-----SNV-VYVASEGVG-SHTVSNHGRDFDLNI--
EPF2-7	--G-NGHGH--G---SVSVGVY-SSEGVG-ST--IS--IRDFDLNI--
EPF2-5a	KLGNHNNHRRDGGHGSV-VT-TSDG-GASTHT---LRDFDLNLP
EPF2-5b	ELGNHNNHRRDGGHGSV-VT-TSDG-GASTHT---LRDFDLNLP
EPF2-4	NL-----GGVSRGDTVI-SSES-GSNAV-----RRDFDLN---
consensus	..qqhN.H...Ggg.S.sv.Vt...SgG.G.STht.....RDFDLN...
SCOF-1	PAFPDF---ST---K---VG-EDVSSPFPVKKRPLVPIPIELQFQ
EPF2-7	PALPFPWPF---G--SG---EDVSSPFP-AKRSRLSFPKLELQGL
EPF2-5a	PS-PELQLGLSIDGLKSGQVPEQEVSSPFP-LKK-----PELL-PSMD
EPF2-5b	PS-PELQLGLSIDGLKSGQVPEQEVSSPFP-LKK-----PELL-PSMD
EPF2-4	PS-PELTLGMSVDCERKS-QLSGEVSFPFP-FKK-----PELL-PRIDCG
consensus	P..Pel..y.a.do..ks.q...EqvSSPFP..KK.....Pel..f...

A)

Induction of SCOF-1 Transcription by Cold or ABA Treatment

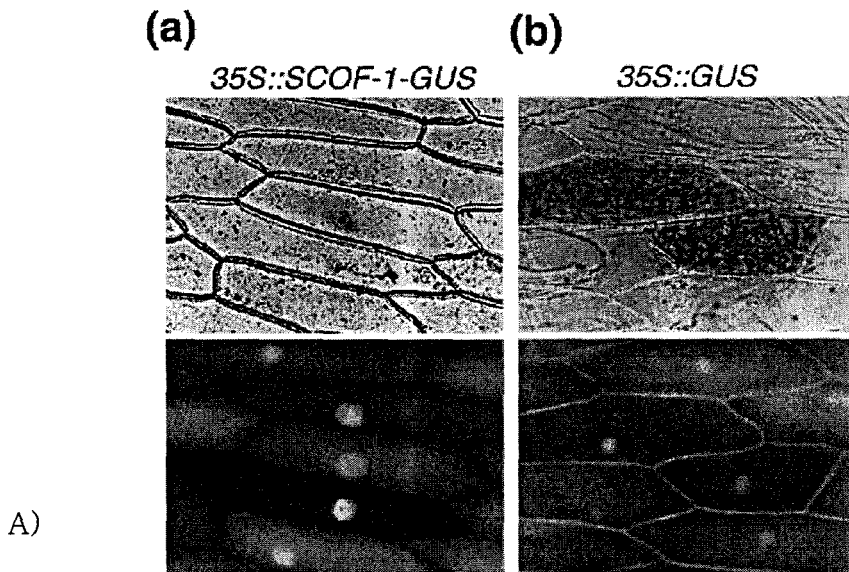


B)

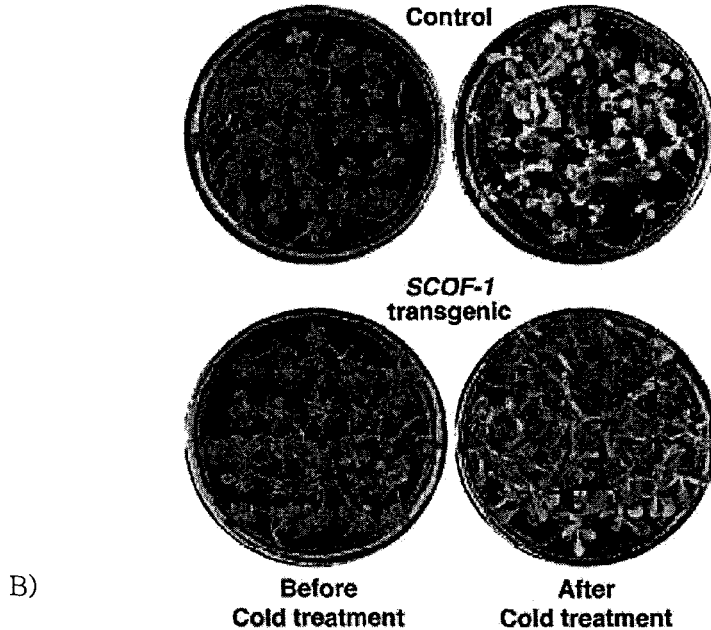
<그림 14. A, Comparison of the deduced amino acid sequence of SCOF-1 with those of the petunia EPF family of zinc finger factors; B, Northern analysis of SCOF-1 >

② Scf-1 유전자의 핵으로의 이동 및 transgenic tobacco의 cold-stress 저항성: Scf-1 단백질은 핵으로 이동가능한 KRKRSKR의 nuclear targeting signal sequence가 있어서 Scf-1-GUS fusion gene construct를 제조한 다음 particle bombardment 방법을 이용하여 onion epidermis cell에 도입한 결과, 그림 15A에서 보는 바와 같이 gus staining의 blue-color가 핵에서만 나타남으로서 Scf-1 protein은 핵으로 이동하여transcription activator의 기능을 수행할 것이라는 사실을 알 수 있었다. 식물체내에서의 Scf-1 기능을 규명하기 위하여 CaMV35S promoter를 이용하여 Scf-1을 over-expression 시킨 다음 Northern analysis로 Scf-1 gene의 발현을 확인하고T2-형질전환 seeds를 cold-stress 처리후 25°C로 옮겨 놓았을 때, WT의 경우는 회복되지 못하였으나, Scf-1 단백질이 over-expression 된 경우는 WT에 비하여 현격하게 회복이 빨랐다 (그림 15B).

Nuclear Localization of SCOF-1



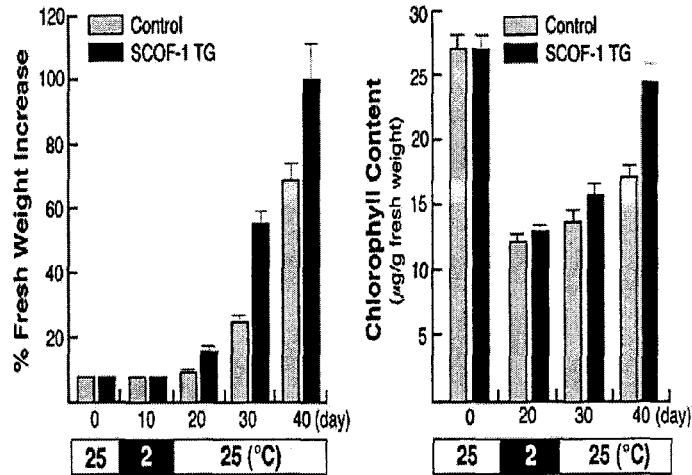
Chilling Tolerance of *SCOF-1* Transgenic Tobacco



<그림 15. Nuclear localization of SCOF-1 protein in onion epidermis cells
(A). Chilling tolerance of SCOF-1 transgenic tobacco plants (B)>

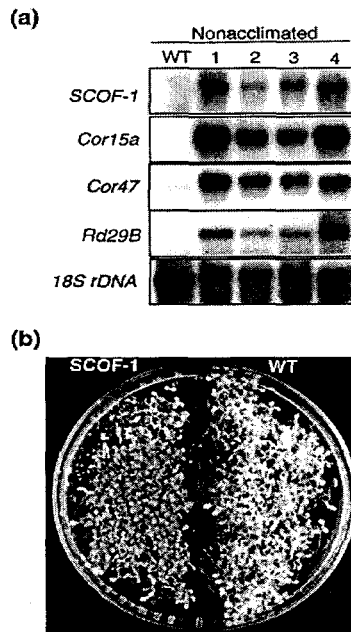
Cold stress 에 의해 발현이 유도되는 COR gene 들의 발현을 조사하기 위하여 Scof-1이 over-expression된 형질전환 *Arabidopsis*를 제조하였다. 그리고 COR15a, COR47, Rd29b 등의 발현여부를 관찰한 결과, 그림 16에서 보는 바와 같이 cold-stress 처리에 의하여 이들 유전자의 발현이 상당한 증가를 보임을 알 수 있었다. 그리고 제조한 형질전환 *Arabidopsis* 식물체의 냉해 저항성 정도를 측정하기 위하여 $-1^{\circ}\text{C}/\text{h}$ 의 온도로 -7°C 까지 내렸다가 다시 25°C 의 배양실로 옮겨놓은 다음 2일이 지나서 식물의 성장을 관찰하여 보았다. WT은 cold-stress에 의하여 완전히 죽어서 회복 불가능의 상태로 된 반면, Tg는 다시 살아나서 생육이 회복되는 사실을 관찰할 수 있었다.

Changes in Fresh Weight and Chlorophyll Content of Transgenic Tobacco Callus



A)

Freezing Tolerance of *SCOF-1* Transgenic *Arabidopsis*



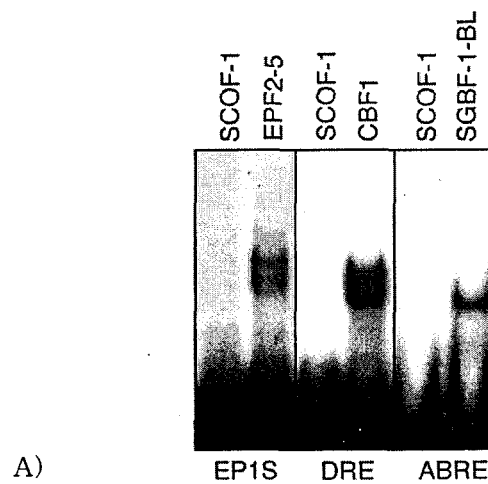
B)

<그림 16. A: Changes in fresh wts and chlorophyll contents of SCOF transgenic

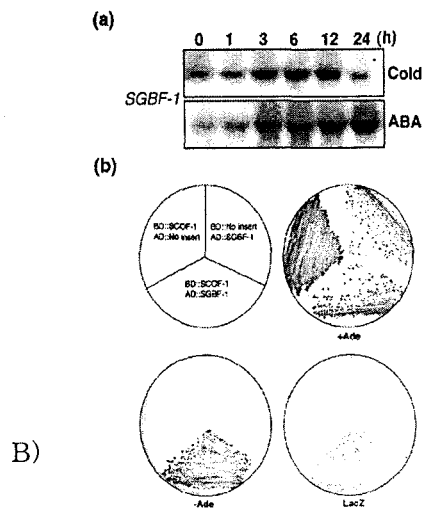
calli. B; COR expression and freezing tolerance of SCOF-1 transgenic Arabidopsis>

③ Scof-1은 bZIP protein과 ABRE와의 *in vivo* interaction 증가; Scof-1이 SGBF과 직접 결합하기 때문에 SGBF1이 COR15a protein의 ABRE sequence에 영향을 주는 지를 관찰한 결과 EMSA 실험결과 Scof-1의 full-length와 bZIP domain만으로 COR15a의 ABRE에 SGBF1의 binding activity를 농도 dependent하게 증가시킴을 관찰할 수 있었다 (그림 17).

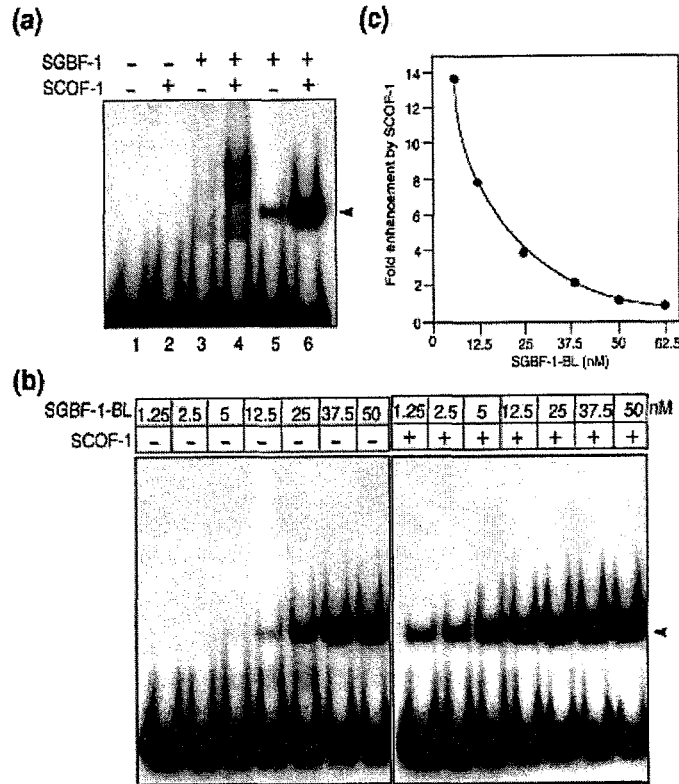
Electromobility Shift Assay of SCOF-1 to Related Cis-element



Interaction of SCOF-1 with SGBF-1



**Enhancement of DNA Binding Activity of SGBF-1
to ABRE Sequence by SCOF-1**



C)

<그림 17. A : Electromobility shift assay of SCOF-1 to the related cis-elements.

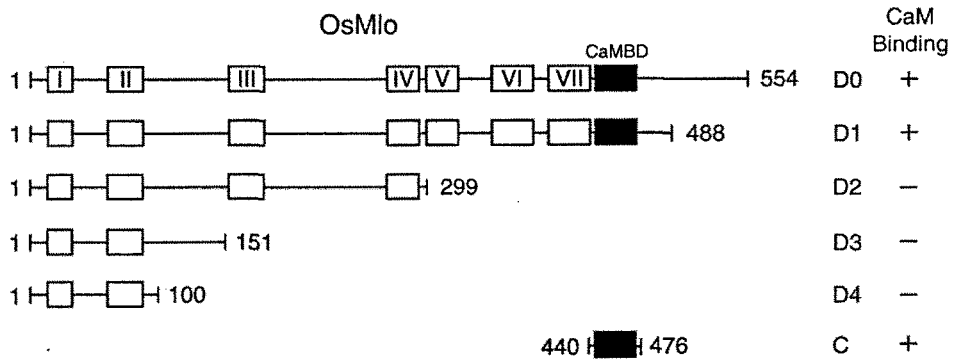
B : Interaction of SCOF-1 with SGBF-1, C : Enhancement of DNA binding activity of SGBF-1 to ABRE sequence by SCOF-1>

2) 신호전달 관련 OsM1o 유전자의 분리 및 기능 연구(Nature 416: 447, 2002 발표)

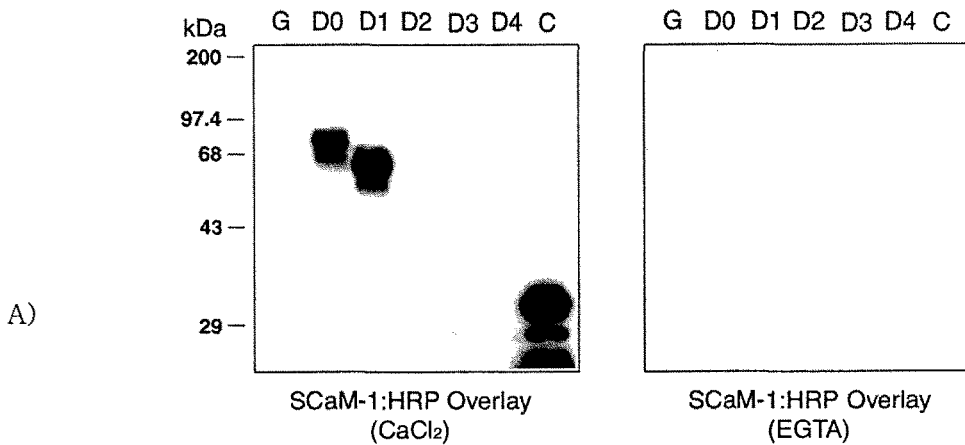
① OsM1o 유전자 분리 및 특성: 다양한 외부스트레스 처리에 의해 강하게 발현되는 식물 생체방어 관련 CaM 유전자의 binding protein들을 HRP-conjugated CaM으로 screening하여 보리 plant defense와 leaf cell death의 modulator로 알려진 M1o

protein과 아미노산 level에서 65% identity를 가진 *Osm1o* (*Oryza sativa M1o*)를 크로닝하였다. *Osm1o* 유전자는 1.6 kb의 cDNA로 이루어져 있으며 7개의 transmembrane domain을 가지는 62 kD의 protein을 encoding하고 있다. *Osm1o* protein내의 CaM-binding domain을 결정하기 위해 C-terminal deletion mutant를 만들었으며, 이를 이용한 CaM:HRP overlay assay를 통해서 CaM이 *Osm1o* protein의 마지막 cytosolic region에 Ca^{2+} -dependent하게 binding함을 확인하였다 (그림 18).

A



B

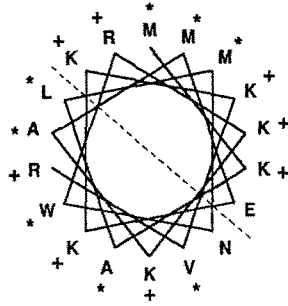


B)

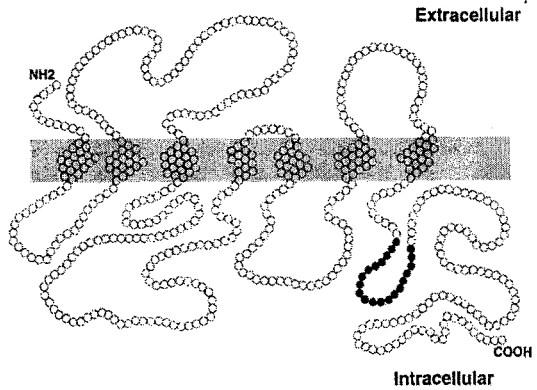
A

OsMlo	443	MKAL	MNWR	KKKME	KKKVR	DA	462
OsMlo1	426	MKAL	MNWR	KKKME	KKKLR	DA	445
OsMlo2	442	MKAL	MNWR	KTA	REKKK	VRDA	461
HvMlo	417	SKAL	TNWR	NTAKE	KKKVR	DT	436
HvMlo1	440	AKAL	TNWR	KMA	KEKKK	ARDA	459
TaMlo1	191	AKAL	TNWR	NTAKE	KKKVR	DT	210
ZmMlo5	77	QQSL	LGWA	QKPK	KRRK	ALRNN	96
ZmMlo8	436	QQV	LGWA	QKVK	KMKK	GLKGA	455
AtMlo1	450	QVGL	VGWA	QKVK	QKRDL	KAA	469
AtMlo8	468	SKAL	KKK	RMAL	VKKKK	VKAT	487

B

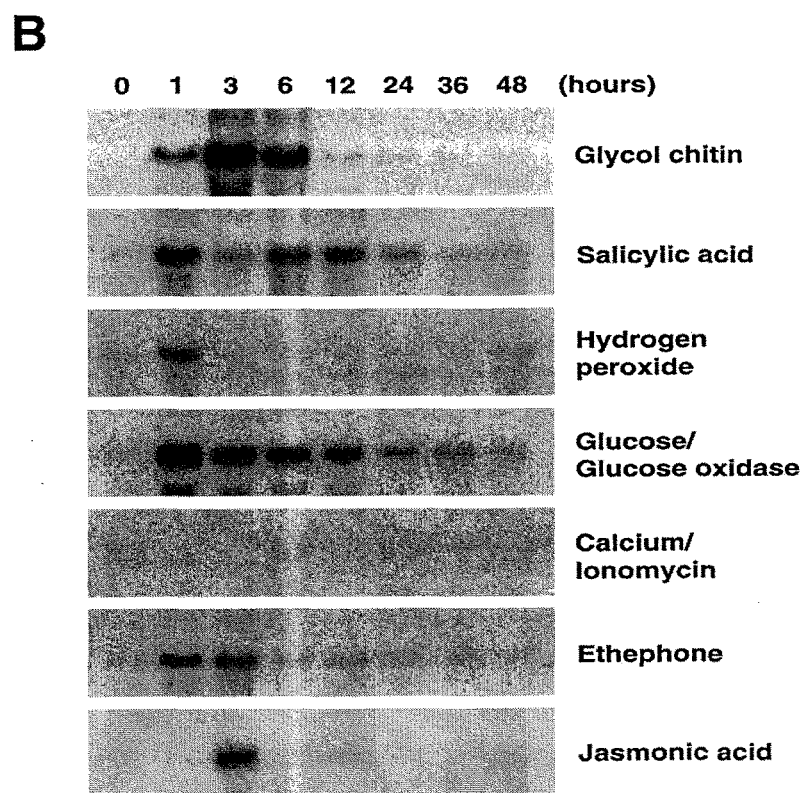
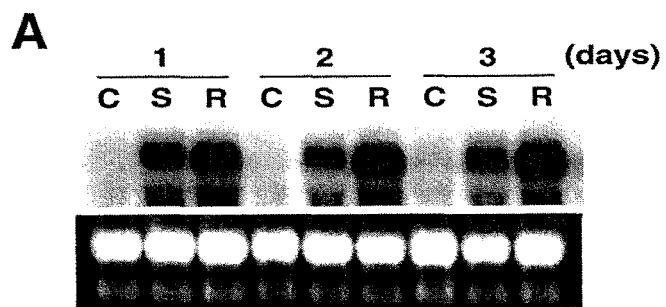


C

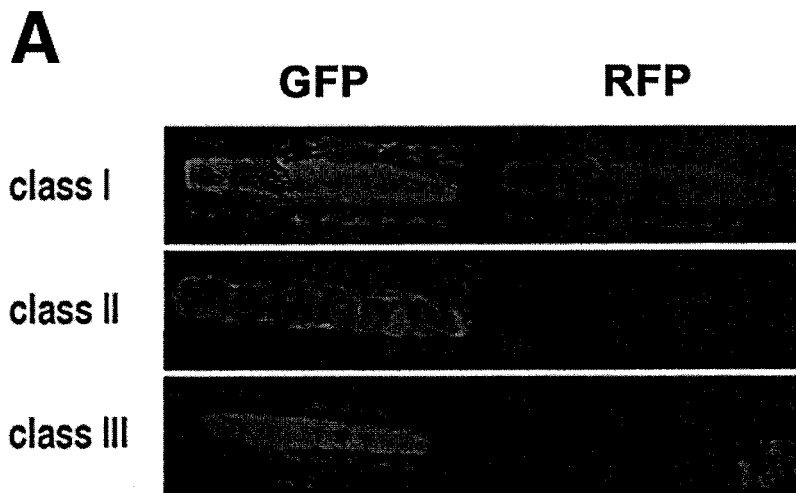


<그림 18. Identification of the CaM binding domain of OsMlo(A), Structural feature of the CaM binding domain of OsMlo (B)>

② 유전자 발현에 의한 OsMlo의 기능규명: Northern blot analysis를 통하여, OsMlo의 gene expression이 fungal pathogen이나 salicylic acid, hydrogen peroxide, jasmonic acid, ethylene과 같은 plant defense signaling molecule등의 처리에 의해서 빠른 시간내에 transient하게 증가됨을 확인 (그림 19)하였으며, pathogen 처리에 의한 OsMlo의 gene induction에는 reactive oxygen species (ROS)의 generation, extracellular Ca²⁺ influx, 그리고 protein phosphorylation등이 중요한 역할을 하고 있음을 여러 가지 inhibitor를 이용한 pharmacological study를 통해서 알 수 있었다.



A)



B

class	% of transfected fluorescent cells	
	-HvG α dsRNAi	+HvG α dsRNAi
I	86.0 \pm 6.0	3.3 \pm 3.5
II	10.0 \pm 6.1	17.6 \pm 6.7
III	4.0 \pm 3.6	79.0 \pm 10.1

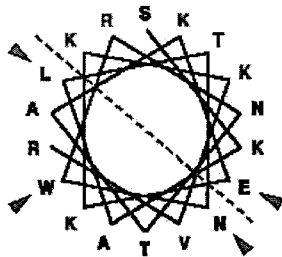
<그림19. *OsMlo*의 gene expression (A) 및 Silencing of HvG α gene expression (B)>

③ CaM 결합과 Mlo활성 영향: 보리 Mlo protein의 CaM-binding domain에 여러가지 mutation을 주고, single cell transient assay를 통하여 Mlo 활성화와 mutation이 갖는 효과를 조사하였다. Mlo 단백질에 의한 식물생체방어 기작에 있어서 CaM의 역할을 *in vivo*에서 증명하기 위하여, CaM 유전자의 silencing과 overexpression이 Mlo 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. CaM의 overexpression은 Mlo 단백질의 활성을 약 40% 정도 증가시켰고, dsRNAi를 통한 CaM 유전자의 silencing은 Mlo 활성을 약 50% 정도 감소시켰다. 즉 CaM이 Mlo의 co-activator로 작용하였다는 사실을 확인하였다 (그림 20).

④ Heterotrimeric Gα와의 연관성: Mlo 단백질은 animal의 Gα coupled receptor와 유사한 7 transmembrane 구조를 가지고 있기 때문에 Mlo-mediated signaling pathway에 있어서 heterotrimeric Gα와의 연관성을 조사하였다. 이러한 결과를 통해서 plant Mlo 단백질은 animal의 Gα과는 다른 조절 기작을 가지며, 그 조절 인자 중의 하나가 CaM임을 확인 할 수 있었다.

A)

Single cell transient assay in Mlo plant

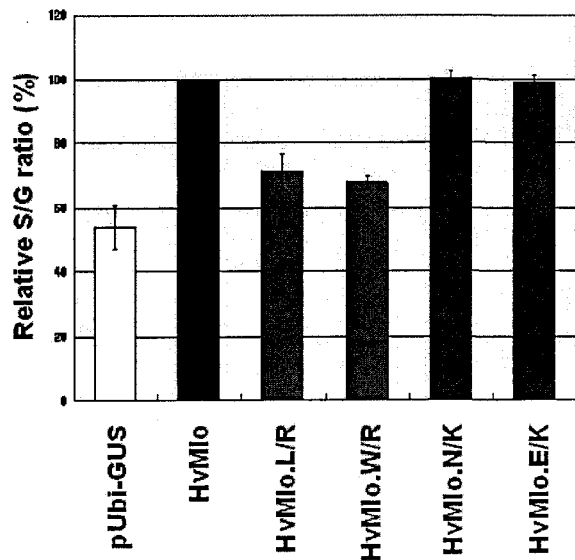


Construct	Relative S/G ratio (%) ^a	Relative reduction (%) ^b
pUbi-GUS	54 ± 6.7 ^c	
pUbi-GUS+HvMlo	100	
pUbi-GUS+HvMlo. L/R	71 ± 5.3	29
pUbi-GUS+HvMlo. W/R	68 ± 1.6	32
pUbi-GUS+HvMlo. N/K	100 ± 2.4	0
pUbi-GUS+HvMlo. E/K	99 ± 2.5	1

^aS/G ratio: susceptible cells expressing GUS/all infected GUS cells × 100

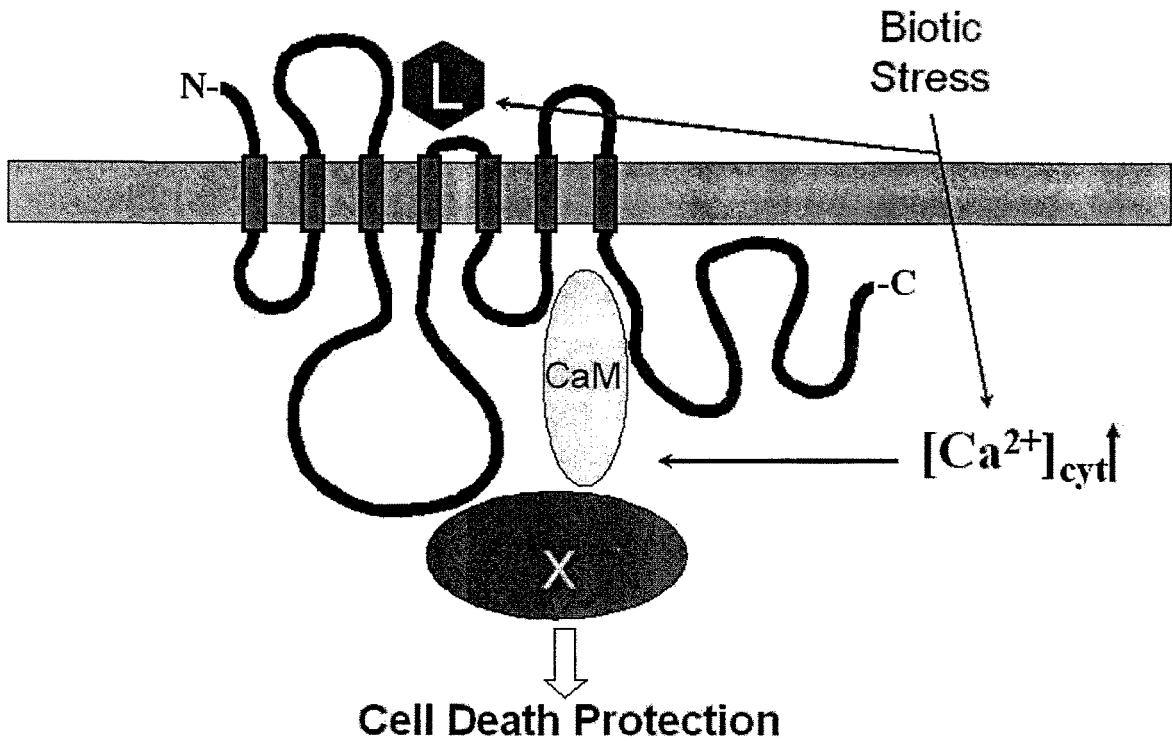
^bRelative reduction: 100 - relative S/G ratio of HvMlo mutant

^cmean ± SE



B)

Mlo, a stress sensor integrating extra- and intracellular stress signals



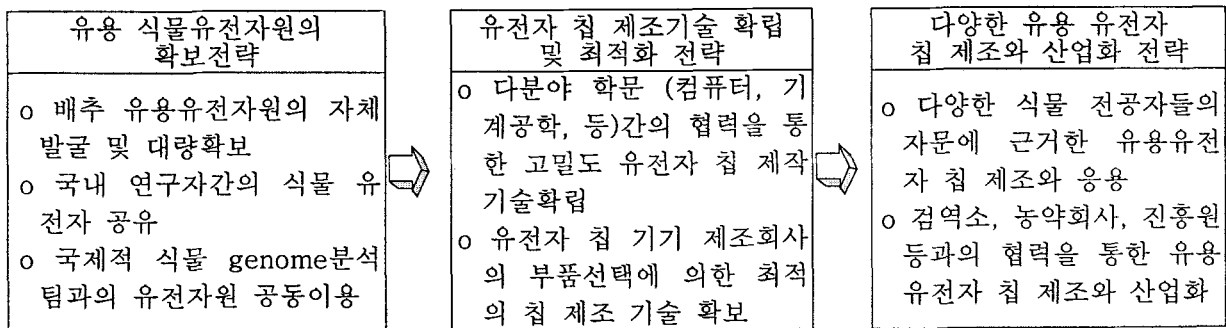
<그림 20. Mlo의 single cell assay(A)와 CaM을 매개한 Mlo의 신호전달 (B)기능>

4장. 목표달성도 및 관련 분야에의 기여도

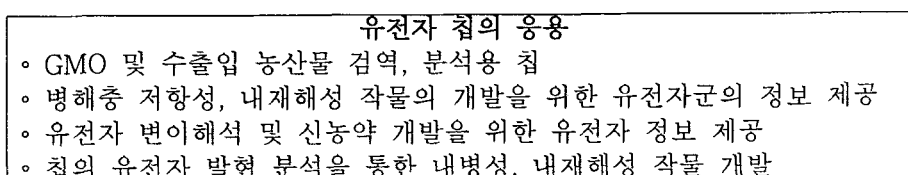
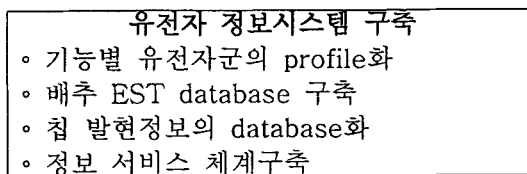
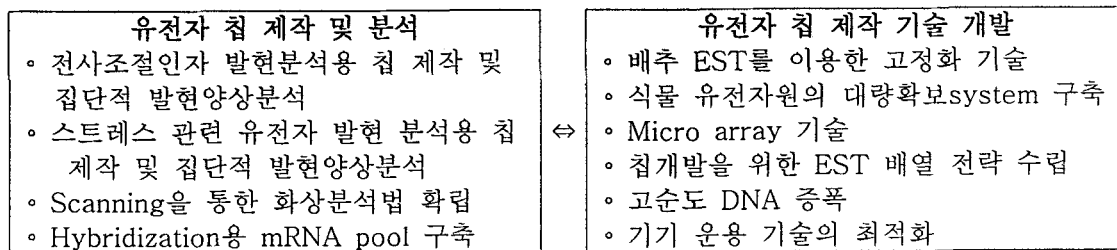
1절. 1단계 연구목표 달성을 위한 연구추진체계

가. 연구개발 추진전략

; 식물로부터 유용유전자 칩의 연구개발 및 응용을 위하여 추진한 연구전략은 다음과 같다.



나. 전단계의 연구개발 추진체계



2절. 목표달성을 위한 평가 착안점 및 관련 분야에의 기여도

가. 목표달성을 위한 평가 착안점 및 달성도

구 분	세부 연구 목표	평가의 착안점 및 척도	달성도
1차년도 (2000년)	○ 유전자 칩 제조기술 및 운용체계확립	- 식물용 DNA 칩 개발에 필요한 제반 기술의 확립 여부	100
	○ 칩 제작용 유전자 자원의 대량 확보	- 식물용 DNA 칩 개발에 필요한 유용 식물 유전자 자원의 대량 확보여부	110
2차년도 (2001년)	○ 유전자 칩 분석기술의 최적화	- 배추 cDNA를 이용한 cDNA 칩 제조여부 - cDNA chip분석의 최적조건 확립여부 - 화상분석에 의한 data 분석법 확립여부	110
	○ 특정 환경에서 발현되는 유전자 집단의 발현연구	- 유전자의 집단적 발현 분석을 위한 mRNA pool 생성 - 특이 환경처리후 칩 분석에 의한 기능별 유전자 발현 분석여부	120

나. 관련분야의 기술발전예의 기여도

본 연구팀에서 연구 개발하고자 하는 유전자 칩의 제조에 필요한 유용 식물 유전자의 확보는, 전 세계대규모 leading 연구팀과 회사들이 경쟁적으로 발굴하고자 하는 핵심적인 연구과제로서 특정 유전자원의 분리와 확보차원이 아닌, 전체 organism의 total genome-sequencing을 수행하고 있다. 따라서 이러한 전체 genome 서열 중 중요한 기능의 유전자원의 확보는 국가적인 차원에서 보호하고, 이들의 확보를 위한 노력을 기울이고 있기 때문에 외국으로부터의 유용 유전자원 도입은 사실상 불가능하다. 그러므로 앞에서 기술한 바와 같이 전 세계적인 연구팀과 경쟁하여 우수한 유용 유전자원을 국내에서 확보하고 확보한 유전자원의 발현 및 조절을 기초로 한 기능규명 연구는 필수적으로 우리 스스로가 수행하여야 하였다. 한편 이러한 유용자원이 확보된 후, 이들 유용 유전자의 기능분석을 위한 고밀도 유전자 array 칩 제작 및 분석 기술은 일부 외국에서의 도입이 가능하지만, 이들의 분석에 필요로 하는 다양한 실험조건의 최적화는 분석하고자 하는 유전자원의 종류와 발현양상에 따라 연구자 모두의 개인적 idea와 응용성을 고려하여 변화시켜야

하였다. 따라서 유전자 칩 분석과 기능규명을 위한 연구 또한 각 연구팀의 특성에 맞추어 독자적으로 확립하여 최적화 해야 되기 때문에 식물 유전자의 집단적 발현 분석에 의한 기능규명과 이러한 연구를 통한 신기능 유전자의 발굴 및 응용에 관한 연구결과는 우리나라 고유의 기술개발에 상당한 기여를 수행하였으며, 1단계에서 확립한 유전자 칩 제조의 최적화된 기술의 개발과 보급은 우리나라의 식물 생명공학의 발달은 물론 bioinformatics 분야와 기능유전체학 및 전자공학, robotics 등의 발전에도 상당한 기여를 하였다고 판단된다. 더욱이 이러한 식물 유전자 칩의 제조 및 분석기술은 우리나라의 여러 생명공학 벤처회사에 전수함으로써 국내의 연구기반 확립에 상당한 기여를 하였다고 판단된다.

제 5장. 연구개발결과의 활용계획

1절. 기술적 측면

:식물 유전자 cDNA 칩 개발 및 응용에 따른 기술적 활용 분야는 표 7와 같이 요약할 수 있겠다.

<표 7. 유전자 칩 제조 및 분석기술 최적화에 따른 기대성과>

유전자 칩 제조기술 확립 및 최적화	기술적 응용 가능분야
○ 유전자 칩 제조를 위한 유전자원의 대량확보 효과	- D/B구축과 국내, 외 연구자에 정보제공에 의한 생명공학 연구 활성화 - 식물의 기관별, 조직별, 다양한 유전자원의 확보와 이용체계 확립 - 식물 DNA chip 응용체계 개발 및 bioinformatics 시스템 구축
○ 유전자 칩 제조 기술 확립 효과	- 유전자 칩 제조기술의 교육, 연수 등에 의한 기술전수와 보급 - 특수 조건에서 발현되는 유전자 칩 제조 및 상품화
○ 유전자 칩 분석 기술의 최적화 및 산업화	- 특정환경에서 발현되는 유전자군의 분류 및 체계화와 기능규명 - 식물 병 진단 및 환경 스트레스 저항성 기작 규명과 - 신기능의 환경스트레스 저항성 작물개발

2절. 경제적 측면

DNA 칩은 유전자 발현해석의 screening이나 mutation을 해석하기 위한 대량처리 도구로서 현재 커다란 주목을 받고 있다. 하지만 DNA 칩은 유전자정보가 없으면 무용지물이다. 따라서 국내에서 식물분야의 가장 많은 유전자 정보와 국제 경쟁력을 가진 본 연구팀에서 식물 DNA 칩 기술을 개발하고 상품화하였을 때 기대되는 경제, 산업적 효과는 표 8과 같이 요약할 수 있겠다.

〈표 8. 유전자 칩 개발 및 응용에 의한 경제, 산업적 기대성과〉

유전자 칩 제조 및 분석	경제, 산업적 응용 가능분야
<ul style="list-style-type: none"> ○ 유용 유전자원 확보 및 기능분석과 응용효과 	<ul style="list-style-type: none"> -유용 유전자 기능분석에 의한 신기능 bio-product 개발 및 생산 -생명공학 기법을 이용한 중화학 공업 제품의 생산공정 대체에 따른 환경보호 및 청정구역 보존 -병, 스트레스 등의 조기진단에 따른 질병예방 및 경제손실 절감가능
<ul style="list-style-type: none"> ○ 유전자 칩 분석에 따른 산업화 효과 	<ul style="list-style-type: none"> -환경 친화적, 고부가가치 산업인 생명공학 산업 개발 -고급인력 수요창출에 의한 고용증진 - 생명공학 산업발전의 파급효과에 의한 관련산업 (전자, 기계, 컴퓨터 등)의 동반발전 유도.

3절. 산업적 응용 측면

본 기술은 기술선진국에서 이미 산업화되고 있고 그 부가가치는 엄청난 것으로 밝혀졌다. 또한 시장 선점을 위해 엄청난 투자와 개발을 하고 있다. 그러나 우리나라의 경우, 식물을 이용한 칩 제작은 아무도 시도한 바가 없기 때문에 본 연구팀이 식물 유전자의 DNA 칩을 개발하게 되면 국제적 경쟁력뿐만 아니라 상품화됨으로써 오는 수입대체 및 수출증대 효과도 매우 클 것으로 예상된다. 본 연구팀에서 확보된 식물 유전자 자원과 유전자 칩을 이용한 산업화 가능분야에 대한 활용방안을 살펴보면 다음과 같다.

- 단시간내 유전자 조작식품의 분석 : 단 한장의 칩으로 지금까지 수행하였던 방법 보다 수십 배 신빙성이 높은 분석 결과를 얻을 수 있다. 분석 시간은 기존의 방법 (3-4일)에 비해 매우 짧다 (6-8시간).
- 수출입 작물의 검역 : 역시 단 한장의 칩으로 수출입 작물의 유전자 조작 여부와 병원체 감염 등을 간단히 진단할 수 있는 칩의 개발이 가능하다.
- 식물체가 갖는 여러 가지 내성 유전자의 검색 : 지금까지 내병성, 내충성, 환경스트레스(가뭄, 고염도, 냉해 등) 저항성 형질전환 식물체를 생산하기 위해 여러 연구자들은 여러 가지 내병성 유전자를 분리하기 위해 많은 시간과 노력을 투자해 왔다. DNA 칩을 사용할 경우 병해충, 스트레스 저항성에 관여하는 유전자를 집단적으로 분리할 수 있으며, 이들 기작에 관여하는 유전자군의 발현 양상을 몇 장의 칩으로 분석 가능하다.

신농약 개발을 위한 정보 제공 : 병원체 방제를 위해 엄청난 농약이 해마다 살포되고 있다. 이들 농약은 환경파괴, 지하수 오염 등 그 피해는 이루 말할 수 없다. 따라서 농약 처리에 의한 병원체의 유전자 발현을 분석함으로써 병원체에 가장 효과적으로 작용할 수 있는 신농약을 개발할 수 있는 집단적 정보를 제공할 수 있다. 병원체의 유전자 발현 분석 역시, 칩이 가장 효과적일 것으로 예상되며 농약 개발을 위한 시간과 노력을 단축할 수 있다.

각종 식물 질병의 진단 : 식물이 곰팡이나 박테리아에 감염되면 그 감염원이 무엇인지 정확히 알 수 없는 경우가 흔하다. 이때, 포장에서 칩을 사용하여 진단을 함으로써 적절한 농약을 선택할 수 있고 바이러스 감염에 대해서는 조기 예방이 가능하다.

칩을 통한 유전자의 형질 개량기술 : 기존에 알려진 특성을 개조하여 인류의 목적과 용도에 맞도록 형질을 개량하고 이들의 안정성이나 효과를 증진시키기 위한 유전자 조작방법의 개발로 현재 사용하고 있는 엄청난 양의 의약품이나 생리활성 물질 등의 특성을 변화시킬 수 있겠다.

내병성, 내재해성 형질전환 작물의 개발 : 유전공학 기법을 이용한 식물의 형질을 변환시키는 방법은 지금까지의 재래적인 농업방법을 개선하여 상당한 노동력을 줄이고 생산단가와 수확량을 증가시킬 수 있는 획기적인 형질전환 수단이다.

기존의 작물 육종법은 많은 시간과 노동력이 요구되나 칩을 육종에 활용할 경우, 시간과 노동력을 절약할 수 있어 보다 효과적인 육종이 가능하다.

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1절. DNA chip 관련 해외과학기술정보

가. DNA chip 관련 회사 현황

DNA chip 연구는 급속히 발달하여 연구과정중에도 외국의 관련 회사가 급속히 증가하여 칩과 관련된 약 130여 회사가 생겼으며 대표적인 회사현황을 정리하면 아래와 같다.

회사명	소재지	내 용	URL
Soane Biosciences	미국	Plastic chip & microfluidic systems	http://www.aclara.com
Genetic MicroSystems	미국	Acquired by Affymetrix	http://www.geneticmicro.com
AVIVA Biosciences	미국	Dedicated to the application of breakthrough multiple-force biochip technology for genomics and proteomics	http://www.avivabio.com/
DNAMicroarray	미국	offers complete "made to order"	http://www.dnamicroarray.com
BioChip tech.	독일	The first company to move into the field of microarrays	http://www.biochip.com/
BioRobotics	영국		
Capital Biochip Co.	중국	exploring cutting edge technologies in microfluidic chips, active microarrays, laboratory-on-chip systems, implantable chips, nanomaterials and diagnostic instrumentations.	http://www.capitalbiochip.com/
Clondiag Chip	독일	Working on generation and applicatiopn of DNA microarrays	http://www.clondiag.com
PamGene	네덜란드	flow-through technology for microarray	http://www.pamgene.com

나. DNA chip 산업동향과 전망

미국의 바이오칩 제품 및 서비스 시장은 연평균 23%씩 성장, 2006년에는 16억불에 달할 것으로 예측된다. 시장 조사 업체인 「프리도니아 그룹」이 최근 발표한 바이오칩 관련 조사 보고서인 'Genomic & Proteomic Application'에 의하면 바이오칩의 수요는 2005년 7.2억불에 이를 것이며, 시약, 기구, 소프트웨어, 기술 및 법률적 보조 산업 등 관련 산업의 규모는 8.8억불을 차지할 것이라고 예측하였다. 현재의 패턴에 비추어 유전학 연구에 광범위하게 사용될 것으로 보이는 DNA 칩은 바이오 칩 수요의 가장 큰 부분을 차지할 것으로 예상된다. 또한 바이오칩 장비의 총 수요는 2006년 2.05억불에 이를 것이며, 연 16%의 성장을 나타낼 것으로 예상하고 있으며 검출, 시료 조작, 하이브리디제이션 (hybridization) 장비 등의 시장은 의약과 기타 생명 과학 분야의 연구원들이 프로테오믹 연구에 다양하게 참여하면서 지속적으로 확대될 것이다. 개선된 감도를 기초로, 고부가가치 마이크로 어레이 표시 (labeling) 및 공정 키트는 바이오칩 시약 및 소모품들 중에서 가장 큰 성장을 보일 것이다. 바이오칩 관련 소프트웨어도 연구원들이 방대한 양의 마이크로 어레이 자료를 저장하고 유전자와 단백질의 복잡한 발현 특성을 판독할 수 있는 프로그램을 구입할 것이기 때문에 상당한 성장을 보일 것으로 예측되었다.

이와함께, 바이오칩 관련 서비스는 2003년부터 연 21%의 성장을 보여 2006년 10.2억불 시장을 형성할 것으로 보인다. 컨설팅 및 위탁계약 수입은 다국적 제약회사들이 의약 개발에 관한 아웃소싱을 늘려갈 것으로 보여, 서비스산업 중 가장 큰 부분을 차지하게 될 것이다. 새로 설치되는 많은 바이오칩 시스템과 기존 시스템의 노후화에 기인하여 유지 보수 (maintenance) 및 기술 지원 산업 또한 상당히 증가할 것이다.

의약 개발 분야는 향후 장기간에 걸쳐 마이크로어레이 기술을 가장 선도적으로 응용할 것이며, 제약사와 바이오텍 업체들 주요 약학대학들은 바이오칩 산업의 도움으로 세 개의 커다란 시장을 지속적으로 형성해 갈 것이다. 의약 진단 제품 제조업체, 농업용 화학물질 생산업체, 병원 및 의료기관, 정부 보건 기관을 포함한 기타 소비자 시장들은 비교적 작은 규모이긴 하지만 다양한 제품과 서비스에 대하여 훌륭한 틈새시장을 형성할 것으로 판단되었다.

2절. 유전자재조합 식물 현황

가. 유전자재조합 농산물 재배 추이

유전자재조합 농작물은 시험재배를 거쳐 1996년부터 본격적으로 상업화를 위해 재배되기 시작하였으며, 1996년 이래로 6년 동안 재배면적이 1.7 Mio ha에서 2001년 52.6 Mio ha로 30배 이상 크게 증가하였다. 제초제 저항성 대두를 필두로 이렇게 유전자재조합 농산물이 빠른 기간 내에 정착하고 증가함으로써 농업 및 이를 원료로 사용하는 식품 제조업 전반에 걸쳐 지대한 파급효과를 미치고 있다.

나. 도입 형질별 재배현황

제초제 내성을 도입한 유전자 재조합 농산물이 1996년에는 23%에서 2001년 76%로 계속 증가하는 추세이고, 다음은 해충 저항성이지만 도입형질별 재배 분포율이 1996년 37%에서 2001년 15%로 감소하였다. 이는 해충 저항성 옥수수를 비롯하여 해충 저항성 특성을 갖는 유전자 재조합 농산물이 당초 기대에 못 미치는 농업적 혜택에 기인한 것으로 판단된다. 2001년 콩이나 옥수수, 면화에 적용한 유전자 특성은 제초제 내성이 전체 52.6 Mio ha 중 77%인 40.6 Mio ha이고 다음이 해충저항성을 가진 것으로 15%인 7.8 Mio ha, 해충 저항성과 제초제 내성은 8%인 4.2 Mio ha, 마지막으로 바이러스 저항성 1%인 0.1Mio ha 재배되고 있다. 2000년과 비교하여 제초제 내성을 가진 형질의 유전자 재조합 농산물이 7.9 Mio ha로 특이할 정도로 증가하였으며 해충 저항성과 제초제 내성이 3.2에서 4.2로 약간 증가한데 비해 해충 저항성을 적용한 경우는 오히려 감소하는 경향을 보였다.

다. 주요 유전자재조합 농산물

대두 63%, 옥수수 19%, 면화 13%, 유채 5%, 감자 1%, 호박 1%, 파파야 1%로 수도 유전자 재조합체 재배현황은 보고 되지 않았다.

3절. 연구개발과정 중 발표된 식물 유전자 칩 관련 논문

연구과정의 개발과 상업화에 따른 연구결과 발표도 매우 활발히 진행되고 있으며, 이와 함께 국제적인 특허건수도 엄청난 속도로 증가하고 있다. 유전자 칩 부분의 대표적인 연구 결과를 살펴보면 다음과 같다.

식물명	분석내용	발표연도	발 표 논 문
Arabidopsis	Mechanical Wounding & Insect Feeding	2000	Plant Cell 12: 707-719
Arabidopsis	Nutrient response	2000	Plant Cell 12: 1491-1509
Arabidopsis	Seed Developing	2000	Plant Physiology 124: 1570-1581
Arabidopsis	Light control	2001	Plant Cell 13: 2589-2607
Arabidopsis	Oxidative Stress	2001	Plant Physiology 127: 159-172
Arabidopsis	Diurnal & Circadian regulation	2002	Plant Cell 13: 113-123
Rose	Fragrance	2002	Plant Cell 14: 2325-2338
Arabidopsis	Low-oxygen response	2002	Plant Cell 14: 2481-2494

제 7장. 참고문헌

- Aitman T.J., Glazier A.M., Wallace C.A., Cooper L.D., Norsworthy P.J., Wahid F.N., Al-Majali K.M., Trembling P.M., Mann C.J., Shoulders C.C., Graf D., St. Lezin E., Kurtz T.W., Kren V., Pravenec M., Ibrahimi A., Abumrad N.A., Stanton L.W., Scott J, Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats, *Nat Genet.* 21(1):76-83, 1999
- Bassett Jr. D.E., Eisen M.B. and Boguski M.S., Geneexpression informatics - it's all in your mine, *Nat. Genet. Supp.* 21:51-55, 1999
- Behr M.A., Wilson M.A., Gill W.P., Salamon H., Schoolnik G.K., Rane S., Small P.M. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray, *Science.* 284(5419):1520-3, 1999
- Brignac S.J. Jr., Gangadharan R., McMahon M., Denman J., Gonzales R., Mendoza L.G., Eggers M. A proximal CCD imaging system for high-throughput detection of microarray-based assays, *IEEE Eng Med Biol Mag.* 18(2):120-2, 1999
- Bryant Z., Subrahmanyam L., Tworoger M., LaTray L., Liu CR., Li M.J., van den Engh G., Ruohola-Baker H. Characterization of differentially expressed genes in purified drosophila follicle cells: toward a general strategy for cell type-specific developmental analysis, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(10):5559-64, 1999
- Burns M.A., Johnson B.N., Brahmasandra S.N., Handique K., Webster J.R., Krishnan M., Sammarco T.S., Man P.M., Jones D., Heldsinger D., Mastrangelo C.H., Burke D.T. An integrated nanoliter DNA analysis device, *Science Oct 16:282(5388):484-7, 1998*
- Chee M., Yang R., Hubbell E., Berno A., Huang X.C., Stern D., Winkler J., Lockhart D.J., Morris M.S., Fodor S.P. Accessing genetic information with high-density DNA arrays, *Science* 274(5287):610-4, 1996
- Chen J.J., Wu R., Yang P.C., Huang J.Y., Sher Y.P., Han M.H., Kao W.C., Lee P.J., Chiu T.F., Chang F., Chu Y.W., Wu C.W., Peck K. Profiling

- expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection, *Genomics* 51(3):313-24, 1998
- Cheung V.G., Gregg J.P., Gogolin-Ewens K.J., Bandong J., Stanley C.A., Baker L., Higgins M.J., Nowak N.J., Shows T.B., Ewens W.J., Nelson S.F., Spielman R.S. Linkage-disequilibrium mapping without genotyping, *Nat Genet.* 18(3):225-30, 1998
- Cho, R.J., Campbell, M.J., Winzeler, E.A., Steinmetz, L., Conway, A., Wodicka, L., Wolfsberg, T.G., Gabrielian, A.E., Landsman, D., Lockhart, D.J., Davis, R.W. A Genome-Wide Transcriptional Analysis of the Mitotic Cell Cycle. *Molecular Cell.* 2:65-73, 1998.
- Davis, R. Parallel Analysis of Genetic Selections Using Whole Genome Oligonucleotide Arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 95:3752-3757, 1998.
- Chu S., DeRisi J., Eisen M., Mulholland J., Botstein D., Brown P.O., Herskowitz I, The transcriptional program of sporulation in budding yeast, *Science.* 282(5389):699-705, 1998
- Cronin, M., Miyada, C., Fucini, R., Kim, S., Masino, R., Wespi, R. Detecting Cystic-Fibrosis Mutations by Hybridization to DNA-Probe. *Biologicals.* 24:209-209, 1996.
- Cronin, M.T., Fucini, R.V., Kim, S.M., Masino, R.S., Wespi, R.M., Miyada, C.G. Cystic Fibrosis Mutation Detection by Hybridization to Light-Generated DNA Probe Arrays. *Human Mutation.* 7:244-255, 1996.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R.G., and Silverman, R.H. Identification of Genes Differentially Regulated by Interferon alpha, beta, or gamma using Oligonucleotide Arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 95:15623-15628, 1998.
- DeRisi J., Penland L., Brown P.O., Bittner ML., Meltzer P.S., Ray M., Chen Y., Su Y.A., Trent J.M. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer, *Nature Genet.* 14(4):457-60, 1996
- DeRisi J.L., Iyer V.R., Brown P.O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale, *Science.* 278(5338):680-6, 1997
- DeSaizieu, A. de, Certa, U., Warrington, J., Gray, C., Keck, W., and Mous,

- J. Bacterial Transcript Imaging by Hybridization of Total RNA to Oligonucleotide Arrays. *Nature Biotechnology*. 16:45-48, 1998.
- Desprez T., Amselem J., Caboche M., Hofte H., Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays, *Plant J* 14(5):643-52, 1998
- Duggan D.J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P. and Trent J.M., Expression profiling using cDNA microarrays, *Nat. Genet. Supp.* 21:10-14, 1999
- Eisen M.B., Spellman P.T., Brown P.O., Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25):14863-8, 1998
- Ermolaeva O., Rastogi M., Pruitt K.D., Schuler G.D., Bittner M.L., Chen Y., Simon R., Meltzer P., Trent J.M., Boguski M.S. Data management and analysis for gene expression arrays, *Nat Genet* 20(1):19-23, 1998
- Fan, J., Wang, D., Berne, A., Siao, C.J., Ghandour, G., Hsie, L., Young, P., Perkins, N., Spencer, J, Morris, D, Kruglyak, L, Sapolsky, R, Nusbaum, C, Topaloglou, T., Hawkins, T, Stein, L, Rozen, S., Lipshutz, R., Hudson, T., Chee, M., Lander, E.S. Genetic Mapping: Finding and Analyzing Single-Nucleotide Polymorphisms with High-Density DNA Arrays. *American Journal of Human Genetics*. 61:1601-1601, 1997.
- Fan, J.B. Accessing the Human Genome with High-Density DNA Arrays. *European Journal of Human Genetics*. 6:134-134, 1998.
- Feriotto G, Detection of the deltaF508 (F508del) mutation of the cystic fibrosis gene by surface plasmon resonance and biosensor technology, *Hum Mutat*. 13(5):390-400, 1999.
- Gentalen, E., and Chee, M. A Novel Method for Determining Linkage between DNA Sequences: Hybridization to Paired Probe Arrays. *Nucleic Acids Research*. 27:1485-1491, 1999.
- Geschwind D.H, Gregg J., Boone K., Karrim J., Pawlikowska-Haddad A., Rao E., Ellison J., Ciccodicola A., D'Urso M., Woods R., Rappold GA., Swerdloff R., Nelson SF. Klinefelter's syndrome as a model of anomalous cerebral laterality: testing gene dosage in the X chromosome pseudoautosomal region using a DNA microarray, *Dev Genet*. 23(3):215-29, 1998
- Gilles P.N., Wu D.J., Foster C.B., Dillon P.J., Chanock S.J. Single nucleotide polymorphic discrimination by an electronic dot blot assay on

- semiconductor microchips. *Nat Biotechnol.* 17(4):365-70, 1999
- Gingeras, T.R., Ghandour, G., Wang, E., Berno, A., Small, P., Drobniewski F., Alland, D., Desmond, E., Holodny, M., and Drenkow, J. Simultaneous Genotyping and Species Identification Using Hybridization. *Pattern Recognition Analysis of Generic Mycobacterium DNA Arrays.* *Genome Research.* 8:435-448, 1998.
- Gray, N.S., Wodicka, L., Thunnissen, A.W., Norman, T.C., Kwon, S., Espinoza, F.H., Morgan, D.O., Barnes, G., LeClerc, S., Meijer, L., Kim S., Lockhart, D., and Schultz, P. Exploiting Chemical Libraries, Structure, and Genomics in the Search for Kinase Inhibitors. *Science.* 281:533-537, 1998.
- Gunthard, F.H., Wong, J.K., Igancio, C.C., Havlir, D.V., and Richman D.D. Comparative Performance of High Density Oligonucleotide Sequencing of HIV Type 1 Pol from Clinical Samples. *AIDS Res. Hum Retroviruses.* 14:869-876, 1998.
- Hacia J.G. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays, *Nat Genet.* 21(1Suppl):42-7, 1999
- Hacia J.G., Edgemon K., Sun B., Stern D., Fodor S.A., and Collins F.S. Two Color Hybridization Analysis Using High Density Oligonucleotide Arrays and Energy Transfer Dyes. *Nucleic Acids Research.* 26(16):3865-3866, 1998.
- Hacia, J.G., Brody, L.C., Chee, M.S., Fodor, S.P.A., and Collins, F.S. Detection of Heterozygous Mutations in BRCA1 using High Density Oligonucleotide Arrays and Two-Colour Fluorescence Analysis. *Nature Genetics.* 14:441-447, 1996.
- Hacia, J.G., Edgemon, K., Hunt, N., Fodor, S., Brody, L.C., and Collins, F.S. Mutation Screening and Phylogenetic Analysis of Hereditary Breast Cancer Genes Using High Density Oligonucleotide Arrays. *American Journal of Human Genetics.* 61:361-361, 1997.
- Hacia, J.G., Makalowski, W., Edgemon, K., Erdos, M.R., Robbins, C.M., Fodor, S.A., Brody L.C, and Collins F.S Evolutionary Sequence Comparisons Using High-Density Oligonucleotide Arrays. *Nature Genetics.* 18:155-158, 1998.
- Hacia, J.G., Sun, B., Hunt, N., Edgemon, K., Mosbrook, D., Robbins, C., Fodor, S.P.A., Tagle, D., and Collins, F.S. Strategies for mutational

- analysis of the large multiexon ATM gene using high density oligonucleotide arrays. *Genome Research*. 8:1245-1258, 1998.
- Hanzel D.K., Trojanowski J.Q., Johnston R.F., Loring J.F. High-throughput quantitative histological analysis of Alzheimer's disease pathology using a confocal digital microscanner, *Nat Biotechnol*. 17(1):53-7, 1999
- Heller R.A., Schena M., Chai A., Shalon D., Bedilion T., Gilmore J., Woolley D.E., Davis R.W. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6):2150-5, 1997
- Holstege, F.C.P., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Lee, T.I., Hengartner, C.J., Green, M.R., Golub, T.R., Lander, E.S., and Young, R.A. Dissecting the Regulatory Circuitry of a Eukaryotic Genome. *Cell*. 95: 717-728, 1998.
- Iyer V.R., Eisen M.B., Ross D.T., Schuler G., Moore T., Lee J.C.F., Trent J.M., Staudt L.M., Hudson J Jr., Boguski M.S., Lashkari D., Shalon D., Botstein D., Brown P.O. The Transcriptional Program in the Response of Human Fibroblasts to Serum, *Science* 283(5398):83-7, 1999
- Jelinsky S.A, Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(4):1486-91, 1999.
- Jelinsky S.A., Samson L.D. Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4):1486-91, 1999
- Khan J., Saal L.H., Bittner M.L., Chen Y., Trent J.M., Meltzer P.S. Expression profiling in cancer using cDNA microarrays. *Electrophoresis* 20(2):223-9, 1999
- Khan J., Simon R., Bittner M., Chen Y., Leighton S.B., Pohida T., Smith P.D., Jiang Y., Gooden G.C., Trent J.M., Meltzer P.S. Gene expression profiling of alveolar rhabdomyosarcoma with cDNA microarrays, *Cancer Res*. 58(22):5009-13, 1998
- Kononen J., Bubendorf L., Kallioniemi A., Barlund M., Schraml P., Leighton S., Torhorst J., Mihatsch M.J., Sauter G., Kallioniemi O.P. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens, *Nat Med* 4(7):844-7, 1998
- Kozal M., Shah, N., Yang R., Shen, N., Fucini, R., Merigan, T., Richman, D., Chee M., Gingeras, T. Natural Polymorphism of HIV-1 Clade-B Protease Gene and Implications for Therapy. *Journal of Acquired Immune Deficiency*

- Syndromes and Human Retrovirology. 10:76, 1995.
- Kozal, M., Shah, N., Shen, N., Fucini, R., Yang, R., Merigan, T., Richman, D.D., Morris, M.S., Hubbell, E., Chee, M. and Gingeras, T.R. Extensive Polymorphisms Observed in HIV-1 Clade B Protease Gene using High Density Oligonucleotide Arrays: implications for Therapy. *Nature Medicine*. 7:753-759, 1996.
- Lashkari D.A., DeRisi J.L., McCusker J.H., Namath A.F., Gentile C., Hwang S.Y., Brown P.O., Davis R.W. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24):13057-62. 1997
- Lashkari D.A., McCusker J.H., Davis R.W. Whole genome analysis: Experimental access to all genome sequenced segments through large-scale efficient oligonucleotide synthesis and PCR, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(17):8945-7, 1997
- Lim, Chae Oh, Ho Yeon Kim, Min Gab Kim, Soo In Lee, Woo Sik Chung, Sung Han Park, Inhwan Hwang and Moo Je Cho. Expressed sequence tags of chinese cabbage flower bud cDNA. *Plant Physiol* 111, 577-588, 1996
- Lipshutz R.J., Fodor S.P.A., Gingeras T.R., and Lockhart D.J., High density synthetic oligonucleotide arrays, *Nat. Genet. Supp.* 21:20-24, 1999
- Lipshutz, R.J., Morris, M.S., Chee, M., Hubbell, E., Kozal, M.J., Shah, N., Shen, N., Yang, R. and Fodor, S.A. Using Oligonucleotide Probe Arrays to Access Genetic Diversity. *BioTechniques*. 19:442-447, 1995.
- Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang C., Kobayashi, M., Horton, H. and Brown, E.L. Expression Monitoring by Hybridization to High-Density Oligonucleotide Arrays. *Nature Biotechnology*. 14:1675-1680, 1996.
- McGall, G., Labadie, J. Brock, P., Wallraff, G., Nguyen, T., and Hinsberg, W. Light-Directed Synthesis of High-Density Oligonucleotide Arrays Using Semiconductor Photoresists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:13555-13560, 1996.
- Moch H., Schraml P., Bubendorf L., Mirlacher M., Kononen J., Gasser T., Mihatsch M.J., Kallioniemi O.P., Sauter G. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray

- screening in renal cell carcinoma, *Am J Pathol.* 154(4):981-6, 1999
- Nilsson P, Mutational scanning of PCR products by subtractive oligonucleotide hybridization analysis, *Biotechniques.* 26(2):308-16, 1999.
- Nilsson P. Quantitative investigation of the modular primer effect for DNA and peptide nucleic acid hexamers, *Anal Biochem.* 10:269(1):155-61, 1999.
- Pastinen T., Ants Kurg., Andres Metspalu., Leena Peltonen, and Ann-Christine Syvanen. Minisequencing: A Specific Tool for DNA Analysis and Diagnostics on Oligonucleotide Arrays, *Genome Research* 7:606, 1997
- Paxton, W.A., Liu, R., Kang, S, Wu. L.J., Gingeras, T.R., Landau, N.R., Mackay, and C.R., and Koup, R.A. Reduced HIV-1 Infectability of CD4(+) Lymphocytes from Exposed-Uninfected Individuals: Association with Low Expression of CCR5 and High Production of Beta-Chemokines. *Virology.* 244:66-73, 1998.
- Rogers Y.H., Jiang-Baucom P., Huang Z.J., Bogdanov V., Anderson S., Boyce-Jacino M.T. Immobilization of oligonucleotides onto a glass support via disulfide bonds: A method for preparation of DNA microarrays, *Anal Biochem* 266(1):23-30, 1999
- Ruan Y., Gilmore J., Conner T. Towards Arabidopsis genome analysis: monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays, *Plant J* 15(6):821-33, 1998
- Sapolsky, R., Hsie, L., Berno, A., Ghandour, G., Mittman, M., and Fan, J.B. High-throughput Polymorphism Screening and Genotyping with High-Density Oligonucleotide Arrays. *Genetic Analysis-Biomolecular Engineering.*14:187-192, 1999.
- Sapolsky, R.J. and Lipshutz, R.J. Mapping Genomic Library Clones Using Oligonucleotide Arrays. *Genomics.* 33:445-456, 1996.
- Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science* 270(5235):467-70, 1995
- Schena M., Shalon D., Heller R., Chai A., Brown P.O., Davis R.W. Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(20):10614-9, 1996

- Shalon D., Smith S.J., Brown P.O. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization, *Genome Res* 6(7):639-45, 1996
- Shoemaker, D.D., Lashkari, D.A., Morris, D., Mittmann, M., and Davis, R.W. Quantitative Phenotypic Analysis of Yeast Deletion Mutants using a Highly Parallel Molecular Bar-Coding Strategy. *Nature Genetics*. 14:450-456, 1996.
- Spellman P.T., Sherlock G., Zhang M.Q., Iyer V.R., Anders K., Eisen M.B., Brown P.O., Botstein D., Futcher B. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization, *Mol Biol Cell*. 9(12):3273-97, 1998.
- Troesch, A., Nguyen, H., Miyada, C.G., Desvarenne, S., Gingeras, T.R., Kaplan, P.M., Cros, P., and Mabilat, C. Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:49-55, 1999.
- Wang K., Gan L., Jeffery E., Gayle M., Gown A.M., Skelly M., Nelson P.S., Ng W.V., Schummer M., Hood L., Mulligan J. Monitoring gene expression profile changes in ovarian carcinomas using cDNA microarray, *Gene*. 229(1-2):101-8, 1999
- Wang, D.G., Fan J.B., Siao, C., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghanour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Kruglyak, L., Stein, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubbell, E., Robinson, E., Mittmann, M., Morris, M., Shen, N., Kilburn, D., Rioux, J., Nusbaum, C., Rozen, S., Hudson, T., Lipshutz, R., Chee, M., and Lander E. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science*. 280:1077-1082, 1998.
- Welford S.M., Gregg J., Chen E., Garrison D., Sorensen P.H., Denny C.T., Nelson S.F. Detection of differentially expressed genes in primary tumor tissues using representational differences analysis coupled to microarray hybridization, *Nucleic Acids Res* 26(12):3059-65, 1998
- Winters, M., Schafer, R., Jellinger, R., Mamtora, G., Gingeras, T., Merigan, T. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Genotype and Drug Susceptibility Changes in Infected Individuals

- Receiving Dideoxyinosine Monotherapy for 1 to 2 years. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41:757-762, 1997.
- Winzeler, E.A., Richards, D.R., Conway, A.R., Goldstein, A.L., Kalman, S., McCullough, M.J., McCusker, J.H., Stevens, D.A., Wodicka, L., Lockhart, D.J., and Davis, R.W. Direct Allelic Variation Scanning of the Yeast Genome. *Science*. 281:1194-1197, 1998.
- Wittes J., Friedman H.P. Searching for evidence of altered gene expression: a comment on statistical analysis of microarray data, *J Natl Cancer Inst*. 91(5):400-1, 1999
- Wodicka, L., Dong, H., Mittmann, M., Ho, M.H., and Lockhart, D.J. Genome-Wide Expression Monitoring in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Nature Biotechnology*. 15:1359-1367,1997.
- Yang G.P., Ross D.T., Kuang W.W., Brown P.O., Weigel R.J. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes, *Nucleic Acids Res*. 27(6):1517-23, 1999
- Zhu, H., Cong, J.P., Mamtora, G., Gingeras, T., and Shenk, T. Cellular Gene Expression Altered by Human Cytomegalovirus: Global Monitoring with Oligonucleotide Arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:14470-14475, 1998.

특정연구개발사업 연구결과 활용계획서				
사업명	중사업명	국책연구 개발사업		
	세부사업명	국가지정 연구실 사업		
과제명	작물의 유전체 연구를 위한 유전자 칩 개발기술과 농업적 응용			
연구기관	경상대학교	연구책임자	이상열	
총연구기간	2000년. 6월. 15일. ~ 2002년. 6월. 14일. (24개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계	
	489,080		489,080	
기술분야	식물자원 생산 이용 기술			
참여기업				
공동연구기관				
위탁연구기관				
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)	1. 기업화 ()	2. 기술이전 ()	3. 후속연구추진(√)	4. 타 사업에 활용()
	5. 선행 및 기 초연구(√)	6. 기타목적활용 (교육, 연구)()	7. 활용중단(미활용)()	8. 기타()
<p>특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.</p> <p>첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부. 2. 기술요약서 1부</p> <p style="text-align: right;">2002 년 11 월 5 일</p> <p style="text-align: right;">연구책임자 : 이 상 열 (인) 연구기관장 : 경상대학교 총장 (직인)</p> <p>과학기술부장관 귀하</p>				

[첨부1]

연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

식물 유전자 칩 분석기술을 이용하여 새로운 유전자 자원을 발굴, 이용하고 2만에서 6만에 이르는 식물 유전자들의 기능연구 뿐만 아니라 병충해 및 환경 스트레스 저항성과 같은 기능별 유전자의 집단적 분류와 이들을 이용한 작물 육종, 첨단 농업, 검역체계, 유전자 재조합 신기능 식물연구 등 광범위한 분야에 활용되어질 수 있도록 식물 유전자 칩을 개발하고 이를 이용하여 식물체의 유전자의 집단적 기능 분석 및 신기능 유전자의 발굴과 새로운 기능의 유전자를 도입한 형질전환 식물체를 제조하여 식물이 받게되는 다양한 환경 스트레스에 저항능을 가지는 형질전환 식물체를 제조하여 농업에 응용하고자 하는 것이다.

2. 연구수행결과 현황 (연구종료시점까지)

가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원(등록)번호	공고일자 출원(등록)일자	발명자 (출원인)	출원국	비 고
A cDNA encoding a novel antifungal peptide, defension, and disease-resistant transgenic plant prepared by overexpressing the gene.	10-2001-0052372	2001.9.4.	경상대학교	한국	
Antimicrobial peptides isolated from the seed of Pharbitis nill cDNA and preparation of disease resistant transgenic plant by overexpressing the gene	10-2001-0073864	2001.11.26.	경상대학교	한국	

나. 프로그램 등록목록 : 해당없음

다. 노하우 내역

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 논문게재 및 발표 실적

학술지명 칭	논문제목 (국제학술지)	게재년 월일	년도 권호	발행기관 (국명)	국명	SCI 여부
Nature	Calmodulin-regulated Mlo, defense suppression functions independently of heterotrimeric G proteins.	2002. 1.	416, 447 (2002)	Nature Publishing Group	UK	o
J. Biol. Chem.	A Chinese cabbage cDNA with high sequence identity to PHGPx encodes a novel isoform of Trx dependent peroxidase.	2001. 11.	277, 12572 (2002)	HighWire Press	USA	o
Plant J.	A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF1, enhances cold tolerance in transgenic plants.	2000. 8.	25; 247 (2001)	Blackwell Science	UK	o
FEBS Lett.	Functional role of 1Cys-Prx in transgenic tobaccoes over-expressing a rice 1Cys-Prx.	2000. 8.	486; 103 (2000)	Elsevier Science	Neth erlan d	o
J. Biol. Chem.	Identification of calmodulin isoform-specific binding peptides from a phage displayed random 22-mer peptide library	2001. 6.	277;21 630 (2002)	HighWire Press	USA	o
J. Biol. Chem.	Mlo, a modulator of plant defense and cell death, is a novel calmodulin binding protein: isolation and characterization of a rice Mlo homologue.	2001. 12.	277;19 304 (2002)	HighWire Press	USA	o
Plant Mol. Biol.	Overexpression of a seed specific anti-microbial peptide from <i>Pharbitis nil</i> enhances resistance to a fungal pathogen in transgenic plants.	2001. 8.	416, 447 (2002)	Kluwer Academic Publishers	Neth erlan d	o
Plant Mol. Biol.	Characterization of a stamen-specific cDNA encoding a novel plant defensin in Chinese cabbage.	2001. 7.	277, 12572 (2002)	Kluwer Academic Publishers	Neth erlan d	o
Plant Cell.	OsMAPK1/BWMK1, a rice MAP kinase, mediates pathogenesis-related gene expression by phosphorylating a transcription factor.	2001. 8.	25; 247 (2001)	Waverly Press	USA	o

학술지명칭	논문제목 (국내학술지)	게재 년월 일	년도 권호	발행기관 (국명)	국명	SCI 여부
Mol. Cells	Cold accumulation of <i>SCOF-1</i> transcripts is associated with transcriptional activation and mRNA stability.	2000 . 10.	486; 103 (2000)	Springer- Verlag	Korea	o
Mol. Cells.	Partial purification and Properties of a PI-4,5- BP hydrolyzing PLC from soluble fraction of soybean sprouts.	2001 . 11.	13;377 (2002)	Springer- Verlag	Korea	o
J. Bioch. Mol. Biol.	Molecular cloning and characterization of a flower specific thionin in Chinese cabbage	2000 . 10.	34;334 (2002)	Springer- Verlag	Korea	x
계: 건수	국제학술지: 9편, 국내학술지: 3편 (SCI 등록학술지: 11편)					

바. 학술대회 발표실적

학술발표제목 (국외학술대회발표)	발표자	발표장소	일시
Biochemical property comparison of Brassica CPRxII isolated from the same plant.	Choi, YO, Lee, KO, Jung, BG, Chi, YH, Lee, JY, Jang, HH, Cho, MJ and Lee, SY,	Quebec, (Canada)	6. 18-24, 2000
Two Distance Species in Chinese Cabbage Flower Bud with Different Inhibitory Activities Against a Cysteine Proteinase, Papain.	Hong, J.K., M.H. Lee, S.-H. Lee, Y.J. Choi, M.J. Cho and C.O. Lim	Quebec, (Canada)	6. 18-6. 24. 2000.
Identification of an calmodulin-regulated soybean Ca^{2+} -ATPase that is located in plasma membrane.	Chung, W.S., C.Y. Park, S.H. Lee, J.C. Kim, M.C. Kim, W.B. Kim, J.F. Harper and M.J. Cho	Quebec, (Canada)	6. 18-6. 24. 2000.
OsRab7 is a rice homologue of the rab-like small G-protein. 6th International Congress of Plant Molecular Biology	Nahm MY, Lee SY, Cho MJ, Bahk JD.	Quebec, (Canada)	6 18-24, 2000

학술발표제목 (국외학술대회발표)	발표자	발표장소	일시
Plant defense signaling mediated by calmodulin isoforms.	<u>Cho, Moo Je.</u>	München, Germany	7. 31. ~ 8. 2. 2000.
Plant Calmodulin Isoforms : Structural and Functional Diversities.	<u>Cho, Moo Je.</u>	Fukuoka, (Japan)	10. 21. ~ 24. 8. 2000.
Calmodulin-mediated plant defense signal transduction	<u>Cho, Moo Je.</u>	Beijing, (China)	10.21. ~ 24., 2000
Biochemical property of a new isotype of a plant peroxiredoxin	Lee, S. S., K. O. Lee, H. H., Chi, S.K. Park, J.R. Lee, M.J. Cho and Lee, S.Y.	Beijing, (China)	10.21. ~ 24., 2000
A Rice Small GTP-Binding Protein ARF Gene Is Activated In Defence Pathways.	Lee, W.Y., K.-A. Yang, C.Y. Kim, S.-H. Lee, Y.J. Choi, J.D. Bahk, M.J. Cho and C.O. Lim	Beijing, (China)	Oct. 21-24. 2000
Biochemical properties of a novel isoform of plant peroxiredoxin	Chi, Y.H., Lee, S.S., Lee, K.O., Park, S.K., Moon, J.C., Yoo, J.Y., Cho, M.J., and Lee, S.Y.	Wisconsin (USA)	6. 23-27 2001
Functional analysis of the 1Cys-Peroxiredoxin in transgenic tobacco plants.	Lee, J.R., Lee, K.O., Jung, B.G., Choi, Y.O., Chi, Y.H., Lee, S.S., Cho, M.J., and Lee, S.Y.	Wisconsin (USA)	6. 23-27 2001
Interaction specificity of the two thioredoxin-h proteins with thioredoxin reductases in Chinese cabbage.	Park, S.K., Lee, K.O., Jung, B.G., Chi, Y.H., Kang, S.S., Moon, J.C., Yoo, J.Y., Son, H.J., Cho, M.J., and Lee, S.Y.	Wisconsin (USA)	6. 23-27 2001
A novel isoform of thioredoxin dependent peroxidase, specifically expressed in flower tissues of Chinese cabbage	<u>Lee Sang Yeol</u>	Moscow (Russia)	10. 23-28, 2001
Functional role of the rice 1Cys-peroxiredoxin in transgenic tobacco.	Park, S.G., Lee, J.R., Lee, K.O., Jung, B.G., Chi, Y.H., Lee, S.S., Cho, M.J., Lee, S.Y. and Lim, D	Moscow (Russia)	10. 23-28, 2001
Characterization of differentially expressed genes in vernalized Chinese cabbage seedlings.	Yang, K.A., J.Y. Kim, M.H. Lee, J.C. Hong, S.Y. Lee, M.J. Cho and C.O. Lim	San Diego, (USA)	1.12-16. 2001
Functional characterization of a rice redox-protein, R1C-Prx, by over-expressing the gene in tobacco plant	Kyun Oh Lee, Jung Ro Lee, Ji Young YOO, Jeong Chan MOON, Hyo Jin SON, and Sang Yeol Lee	San Diego (USA)	1.12-16. 2001

학술발표제목 (국외학술대회발표)	발표자	발표장소	일시
The pathogen and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part via the interaction of NaCl-induced Element and a GT-1-like transcription factor	Park HC, Cho MJ	Tokyo (Japan)	Feb. 6 2002
Characterization of differentially expressed genes in vernalized chinese cabbage (<i>Brassica campestris</i> L. ssp. <i>perkinensis</i>) seedling	Yang KA, Kim JY, Lee MH, Hong JC, Lee SY, Cho MJ, Lim CO	Tokyo (Japan)	Feb. 6 2002
Differential character of two distinct phytoalexin isoforms from chinese cabbage	Hong JK, Lee SY, Yun D-J, Cho MJ, Lim CO	Tokyo (Japan)	Feb. 6 2002
Interaction of a calmodulin isoform with a MYB in modulating plant salt tolerance	Jeong JC, Cho MJ	Tokyo (Japan)	Feb. 6 2002
A chinese cabbage cDNA highly homologous to glutathione peroxidase gene is codes for a novel isoform of thioredoxin-dependent peroxidase	Lee SS, Lee SY	Tokyo (Japan)	Feb. 6 2002
Characterization and differential expression of Prx isotypes in Chinese cabbage	JANG, HH, LEE, KO, CHI, YH, PARK, SK, LEE, JR, LEE, SS, CHO, MJ, and <u>LEE, S Y.</u>	서울대	10.25-26., 2000
Transgenic tobacco over-expressing a rice 1Cys-peroxiredoxin	LEE, Ji Yeun, JUNG, Bae Kyo, LEE, Kyun Oh, JANG, Ho Hee, CHI, Yong Hun, CHOI, Yeon Ok, Lim and Sang Yeol Lee	서울대	10.25-26., 2000
A novel isoform of thioredoxin-dependent peroxidase, which is specifically expressed in flower tissues of Chinese cabbage.	Bae Gyo Jung, Seung Sik Lee, Lee Kyun Oh, Chi Yong Hoon, Jang Ho Hee, and Sang Yeol Lee	포항공대	1. 21-22. 2002
Calmodulin-regulated soybean Ca ²⁺ -ATPase located in the plasma membrane.	<u>Cho, Moo Je.</u>	충남, 도고	8.25.-8. 26. 2000

학술발표제목 (국내 학술대회발표)	발 표 자	발표장소	일 시
A hevein-like chitin-binding protein from seeds of <i>Pharbitis nil</i> induces the growth arrest via depolarization of actin cytoskeleton in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	Koo, S.C., B.Y. Lee, J.C. Koo, D.W. Bae, D.J. Yun and M.J. Cho.	서울대	10. 23-24. 2000
Molecular and biochemical characterization of three novel elicitor-responsive rice genes (<i>OsERGs</i>) encoding C2 domain proteins.	Koo, Y.D., C.Y. Kim, B.C. Moon, C.H. Kang, H.C. Park, J.M. Jun, S-H. Lee, C.O. Lim, K.Y. Kang and M.J. Cho.	서울대	10. 23-24. 2000
Biological effect of calmodulin and Mlo protein interaction on plant disease resistance.	Choi, M.S., M.C. Kim, J.K. Kim, H.J. Chun, J.C. Kim, W.S. Chung, C.Y. Park, H.W. Yoon and M.J. Cho.	서울대	10. 23-24. 2000
Characterization of a novel cis-acting element in the promoter of specific soybean calmodulin isoform, SCaM4, that is responsive to pathogen signals.	Park, H.C., Y.H. Kang, J.H. Yoo, J.M. Jeon, H.J. Chun, J.C. Kim, W.S. Chung, J.S. Kim, J.C. Hong and M.J. Cho.	서울대	10. 23-24. 2000
SCOF-1, a novel zinc finger protein from soybean enhances cold tolerance in transgenic plants.	Kim, J.C., H.J. Chun, W.S. Chung, H.C. Park, B.C. Moon, J.H. Yoo, C.Y. Park, J.C. Jung, H.W. Yoon and M.J. Cho.	서울대	10. 23-24. 2000
Isolation and characterization of calcium-dependent protein kinase (<i>OsCDPKs</i>) from rice.	Moon, B.C., Y.H. Jeong, C.Y. Kim, J.C. Jeong, H.W. Yoon and M.J. Cho.	서울대	10. 23-24. 2000
Characterization of a novel cis-acting element in the promoter of specific soybean calmodulin isoform, SCaM4, that is responsive to pathogen signals.	Park, H.C., Y.H. Kang, J.H. Yoo, J.M. Jeon, H.J. Chun, J.C. Kim, W.S. Chung, J.S. Kim, J.C. Hong and M.J. Cho.	서울대	10. 23-24. 2000
SCOF-1, a novel zinc finger protein from soybean enhances cold tolerance in transgenic plants.	Kim, J.C., H.J. Chun, W.S. Chung, H.C. Park, B.C. Moon, J.H. Yoo, C.Y. Park, J.C. Jung, H.W. Yoon and M.J. Cho.	서울대	10. 23-24. 2000
Isolation and characterization of calcium-dependent protein kinase (<i>OsCDPKs</i>) from rice.	Moon, B.C., Y.H. Jeong, C.Y. Kim, J.C. Jeong, H.W. Yoon and M.J. Cho.	서울대	10. 23-24. 2000
Overexpression of soybean calmodulin isoforms enhanced salt tolerance in transgenic <i>Arabidopsis</i> plants.	Yoo, J.H., C.Y. Park, H.C. Park, J.C. Kim, H.M. Ok, J.C. Jung and M.J. Cho.	서울대	10. 23-24. 2000
Isolation and characterization of a divergent <i>Arabidopsis</i> calmodulin isoform (ACaM8) which shows different abilities to activate CaM-dependent enzymes.	Park, C.Y. S.H. Lee, W.D. Heo, W.S. Chung, J.H. Yoo, H.J. Chun, H.M. Ok and M.J. Cho.	서울대	10. 23-24. 2000

학술발표제목 (국내학술대회발표)	발 표 자	발표장소	일 시
A plasma membrane localized soybean Ca ²⁺ -ATPase (SCA-1) is regulated by two calmodulin binding domains.	Chung, W.S., S.H. Lee, H.M. Ok, J.C. Kim, W.D. Heo, M.C. Kim, C.Y. Park, H.C. Park, C.O. Lim and M.J. Cho.	서울대	1 0 . 23-24. 2000
Sensing Specificity of Ca ²⁺ -Signals.	<u>Cho, Moo Je.</u>	충북, 괴산	2. 1. ~ 3 . 2001
Biological effects of the interaction between calmodulin and Mlo protein on plant defense responses.	Kim, M.C. and <u>M.J. Cho.</u>	경남, 김해	5. 25., 2001
Calmodulin-regulated Mlo defense suppression functions independently of heterotrimeric G proteins.	Kang, Y.H., M.C. Kim, H.J. Chun, M.S. Choi, B.C. Moon, C.H. Kang, C.Y. Park, J.S. Kim, Schulze-Lefert, P. and M.J. Cho.	서울 교육 문화회관	10. 1 1. ~ 12. 2001
The pathogen and NaCl-induced expression of the soybean CaM-4 promoter is mediated in part via an GT element.	Kim, M.R., H.C. Park, J.H. Yoo, J.M. Jeon, J.C. Hong and M.J. Cho.	서울 교육 문화회관	10. 1 1. ~ 12. 2001
A specific calmodulin isoform confers salt tolerance in plants via a MYB activation.	Jeong, J.C., M.S. Cheong, J.H. Yoo, J.S. Lee, J.C. Kim, W.D. Heo, H.C. Park, M.C. Kim, B.C. Moon and M.J. Cho.	서울 교육 문화회관	10. 1 1. ~ 12. 2001
Cloning and characterization of an Arabidopsis gene encoding a calmodulin binding protein with BAG domain.	Kang, C.H., Y.H. Kang, M.S. Choi, M.C. Kim, B.O. Park, Y.D. Koo and M.J. Cho.	서울 교육 문화회관	10. 1 1. ~ 12. 2001
Calmodulin-mediated plant defense signaling.	<u>Cho, Moo Je.</u>	동아대	9. 22. 2001
Analysis of the gene expression profile of chinese cabbage by ESTs generation	Ryu, S.H., J.S. Kang, H.R. Suk, S.Y. Lee, M.J. Cho and C.O. Lim.	서울대	1 0 . 23-24. 2000.
Development of Tobacco Mosaic Virus in Infection Sites and Expression of Defective TMV Movement Proteins in Nicotiana benthamiana.	Lee E.Y., Hong J.K., Yun D-J., Lee S-H., Choi Y.J., Cho M.J., and Lim C.O.	Chunju	4. 27. 2001
Monitoring the Expression Pattern of Chinese Cabbage Flower Senescence using a cDNA Macroarray	Lee M.H., Yang K.A., Kim, J.Y., Hong J.C., Lee S.Y., Cho M.J., and Lim C.O.	포항공대	8 . 9 - 10 . 2001

학술발표제목 (국내학술대회발표)	발 표 자	발표장소	일 시
Comparative gene-expression analysis of vernalization using a Chinese cabbage cDNA Microarray.	Yang K.A., Kim J.Y., Lee M.H., Hong J.C., Lee S.Y., Cho M.J. and Lim C.O.	한양대	1 0 . 18-19, 2001
Gene Expression Profiles during the Hydrogen Peroxide Stress in Chinese cabbage.	Kim J.Y., Yang K.A., Lee M.H., Choi Y.J., Hong J.C., Lee S.Y., Cho M.J. and Lim C.O.	서울 교육 문화회관	1 0 . 1 1 - 1 2 , 2001
Making Chinese cabbage Microarrays.	Yang K.A., J.Y. Kim, M.H. Lee, J.C. Hong, S.Y. Lee, M.J. Cho, and C.O. Lim	포항공대	1 . 21-22, 2002
Transient expression of PEG-mediated gene in mesophyll protoplasts of pepper (<i>Capsium annuum</i> L.).	Jeon J.M., Ha Y. I., Joung H, K., Lee Y. S., Choi Y. J., Lim C. O., and Lee S. H.	경주	11. 16-17, 2001
배추 화아로부터 분리한 cysteine proteinase inhibitor cDNA clones 의 생화학적, 분자생물학적 특성 연구	홍준기, 양경애, 이명희, 이상열, 최영주, 조무제, 임채오	포항공대	2.5-6, 2001
모델 곰팡이를 이용한 식물생체방어 단백질의 기능해석	이보영, 구자춘, 구성철, 조무제, 윤대진	포항공대	2.5-6, 2001
벼로부터 분리한 ADP-ribosylation factor type I의 분자생물학적 특성 연구	이원영, 김차영, 박정동, 조무제, 임채오	포항공대	2.5-6, 2001
Biochemical and molecular characterization of two cDNA clones encoding cysteine proteinase inhibitor from chinese cabbage (<i>Brassica campestris</i> L. ssp. <i>pekinensis</i>) flower bud	Hong JK, Lee MH, Yang KA, Lee SH, Choi YJ, Cho MJ, Lim CO	경상대	4. 13, 2001
cDNA microarray analysis of hot pepper (<i>Capsium annuum</i>) fruit using 1920 cDNA clones	Choi JS, Park JY, Kim ST, Kim SH, Yi MJ, Shin SY, Song YH, Song WY, Oh BJ, Lim CO, Kang KY, Hong JC	포항공대	1.21-22, 2002
계: 건 수	58건 (국제학술회의발표: 23건 국내학술회의 발표: 35건)		

3. 연구성과

- 가. 신기능 유전자를 이용한 병 저항성 형질전환 식물체의 제조 및 응용기술의 산업화 추진중.
- 나. 병 저항성 신기능 유전자의 발현조절을 위한 promoter의 개발과 응용에 관한 기술이전 추진중

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

- 가. 당해연도 활용계획: 유전자 칩의 발현분석을 통하여 발굴한 강력한 병 저항성 신기능 유전자의 genomic clone으로부터 이 유전자의 발현조절 promoter을 분리하고 발현특성을 규명함으로써 inducible promoter를 제조하였으며 이를 이용한 inducible vector의 제조와 유용 유전자의 발현조절 형질전환 식물체 개발 및 기술이전 추진 및 기술이전 추진 중
- 나. 활용방법: Inducible promoter를 이용한 유용 유전자의 발현 조절이 가능한 형질전환 식물체 개발
- 다. 차년도 이후 활용계획: 유용물질의 대량생산이나 특정 환경에서 발현이 요구되는 단백질의 생산에 inducible promoter을 이용한 발현조절 시스템 개발중임

5. 기대효과

- 가. 유용 유전자원 확보 및 기능분석과 응용효과
 - 유용 유전자 기능분석에 의한 신기능 bio-product 개발 및 생산
 - 생명공학 기법을 이용한 중화학 공업 제품의 생산공정 대체에 따른 환경보호 및 청정구역 보존
 - 병, 스트레스 등의 조기진단에 따른 질병예방 및 경제손실 절감가능
- 나. 유전자 칩 분석에 따른 산업화 효과
 - 환경 친화적, 고부가가치 산업인 생명공학 산업 개발
 - 고급인력 수요창출에 의한 고용증진
 - 생명공학 산업발전의 파급효과에 의한 관련산업 (전자, 기계, 컴퓨터 등)의

동반발전 유도.

위와같은 산업적 응용에 따른 경제적인 수익은 2005년 까지의 생명공학 발달과정을 추정해 볼 때, 예상매출액이 약 20억원, 수입대체효과가 약 50억원, 수출증대효과가 약 100억원 기타 유전자 칩 제조에 의한 전자공학이나 정밀 기계공학 등의 발달에 의한 고용창출효과 및 투자유치실적와 인프라구축 효과 등을 감안할 때, 최소 1000억원 정도의 수익이 발생할 것으로 추정됨

6. 문제점 및 건의사항: 가능한 한 보고서의 양식을 통일하여, 유사한 보고서의 중복제출을 요구하지 않으면 좋겠음.

[첨부2]

기술 요약서

■ 기술의 명칭

유전자 칩의 발현분석을 통하여 발굴한 강력한 병 저항성 신기능 유전자의 promoter를 이용한 inducible promoter를 제조 및 유용 유전자의 발현조절 형질전환 식물체 개발

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	2000-N-NL-01-C-236			
과제명	작물의 유전체 연구를 위한 유전자 칩 개발과 농업적 응용			
사업명	국책연구 개발사업			
세부사업명	국가지정 연구실 사업			
연구기관	경상대학교	기관유형	대학	
참여기관(기업)				
총연구기간	2000. 6. 15. -2002. 6. 14.			
총연구비	정부(489,080)천원	민간()천원	합계(489,080)천원	
연구책임자 1	성명	이상열	주민번호	
	근무기관 부서	응용생명과학부	E-mail	sylee@nongae.gsnu.ac.kr
	직위/직급	교수	전화번호	055-751-5958
연구책임자 2	성명	조무제	주민번호	
	근무기관 부서	응용생명과학부	E-mail	mjcho@nongae.gsnu.ac.kr
	직위/직급	교수	전화번호	055-751-5957
연구책임자 2	성명	임채오	주민번호	
	근무기관 부서	응용생명과학부	E-mail	colim@nongae.gsnu.ac.kr
	직위/직급	조교수	전화번호	055-751-6255
실무연락책임자	성명	황유진	소속/부서	식물분자 우수연구센터
	직위/직급	기능직 9급	E-mail	pmbbrc@nongae.gsnu.ac.kr
	전화번호	055-751-5188	FAX	055-759-9363
	주소	(660 - 701) 경남 진주시 경상대학교 우수연구센터		

■ 기술의 주요내용

[기술의 개요]

유전자 칩의 발현분석을 통하여 발굴한 강력한 병 저항성 신기능 유전자의 genomic clone으로부터 이 유전자의 발현조절 promoter을 분리하고 발현특성을 규명함으로써 inducible promoter를 제조하였으며 이를 이용한 inducible vector의 제조와 유용 유전자의 발현조절 형질전환 식물체 개발 및 기술이전 추진중

<기술적 특징>

- (1) 강력한 병 저항성 유전자의 promoter 발굴 및 특성분석 완료
- (2) 병 저항성 발현의 inducible promoter 제조
- (3) 병 저항성 inducible의 promoter의 발현조절기작 규명완료

[용도·이용분야]

- (1) Inducible promoter로서의 vector로의 이용
- (2) 유용 단백질의 특이조건에서의 발현조절 및 과발현 유도
- (3) 내병성 형질전환 식물체의 제조 및 농업적 응용

